

15This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 31/155, 31/15, 33/44, 31/44, 31/195, 38/38, A61M 1/28</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/10606</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04521</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月23日(23.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/237108 1998年8月24日(24.08.98) JP 特願平11/155393 1999年6月2日(02.06.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 黒川 清(KUROKAWA, Kiyoshi)[JP/JP] 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 宮田敏男(MIYATA, Toshio)[JP/JP] 〒259-1117 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DRUGS FOR RELIEVING CARBONYL STRESS AND PERITONEAL DIALYSATES</p> <p>(54)発明の名称 カルボニルストレス状態改善剤、および腹膜透析液</p> <p>(57) Abstract Drugs for relieving carbonyl stress in the peritoneal cavity to be used in peritoneal dialysates which contain carbonyl compound-trapping agents as the active ingredient. Carbonyl compounds formed and accumulated during peritoneal dialysis are inactivated or eliminated by carbonyl compound-trapping agents such as aminoguanidine. Carbonyl compounds formed during the sterilization and storage of peritoneal dialysates are eliminated by preliminarily bringing into contact with the trapping agents. Further, addition of the trapping agents to peritoneal dialysates or circulation of the trapping agents by using a cartridge for trapping carbonyl compounds makes it possible to eliminate carbonyl compounds originating in the blood of the patients which flow into the peritoneal cavity as the dialysis proceeds. Thus, modification of proteins in the peritoneal cavity can be inhibited and peritoneal damage in association with peritoneal dialysis can be relieved.</p>		

## (57)要約

カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析液における腹腔内のカルボニルストレス改善剤。アミノグアニジンなどのカルボニル化合物トラップ剤によって、腹膜透析液中に生成・蓄積するカルボニル化合物が不活性化、あるいは除去される。腹膜透析液の液滅菌中および保存中に生成したカルボニル化合物は、予めトラップ剤と接触させることにより除去される。またトラップ剤を腹膜透析液に添加したり、カルボニル化合物トラップ用カートリッジを用いて循環させることで、腹膜透析に伴い腹腔内に流出する患者血液由来のカルボニル化合物の除去も可能となる。本発明によりカルボニル化合物による腹膜内蛋白の修飾を抑制し、腹膜透析に伴う腹膜傷害を軽減できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MC	モナコ	TD	チャード
BJ	ベナン	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GN	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	YC	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

カルボニルストレス状態改善剤、および腹膜透析液

### 技術分野

本発明は、腎不全患者の治療に用いられる腹膜透析液に関する。

### 背景技術

慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析とがある。腹膜透析とは、腹腔内に透析液を一定時間蓄留させ、体内の老廃物を腹膜を通して透析液中へ排泄させた後、透析液を回収することにより行われる透析方法である。腹膜透析は、間欠的腹膜透析法（IPD）と持続的外来腹膜透析法（CAPD：continuous ambulatory peritoneal dialysis）に大別される。CAPD法は、IPD法の長所を取り入れ、腹腔内に注入する灌流液の貯留時間を長くして、1日4回程度の液交換とする腹膜透析法である。

腹膜透析は簡便で時間的な拘束が少ないなどの長所を持つが、腹膜透析を長期間続けていると次第に除水能が低下し、腹部のタンパク質の変性や硬化、腹膜融合などが起きることが知られている。

これらの原因の一部は、腹膜透析液に含まれるグルコースにあると考えられる。現在、使用されている腹膜透析液の多くは、浸透圧調節剤としてグルコースを含有する。グルコースは熱に対して不安定で、滅菌時に一部が分解し、タンパク質を修飾し得る反応性の高いカルボニル化合物が分解産物として生成すると考えられる。また、グルコースを含む腹膜透析液は、滅菌後、保存中にも分解産物が生成・蓄積すると考えられる。

一般にグルコースの分解は、中性付近から塩基性側で生じ易いことから、通常の腹膜透析液では、グルコースの安定性を考慮して、酸性側（pH 5.0～5.4）のp



Hを与える緩衝系が用いられることが多い。ところが、このような酸性の腹膜透析液は、腹腔マクロファージの免疫防御機構の低下や細菌の進入による腹膜炎の発生、腹膜中皮細胞への傷害性などが危惧される。このような相反する問題点を解消するために、中性付近における腹膜透析液中のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物生成防止、あるいはカルボニル化合物の除去が切望されていた。

一方、高濃度のグルコースが配合された腹膜透析液は、タンパク質を修飾するなど、腹膜にとって好ましくないとの観点から、より分解物の生成が低いグルコースポリマーを用いた腹膜透析液が開発されている（特開平10-94598号、Wilkie, M.E. et al., *Perit. Dial. Int.*, 17: S47-50 (1997)）。

さらに同様の視点から浸透圧調節剤としてグルコースに代えてシクロデキストリン（特開平8-71146号）、二糖類（特開平8-131541号）、アミノ酸(Faller, B. et al., *Kidney Int.*, 50(suppl.56), S81-85 (1996))を使用した腹膜透析液も提案されている。また、システインを添加してグルコースの分解を抑制した腹膜透析液も開示されている（特開平5-105633号）。

これらの方法はいずれも、腹膜透析液中の高濃度グルコースに起因する不都合の改善を目的としたものである。

ところで、慢性腎不全の患者では、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGE (Advanced glycation end products) が著しく蓄積していることが報告されている (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 1170-1181 (1997)、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7: 1198-1206 (1996)、Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 54:1290-1295(1998)、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:2349-2356(1998))。腎不全においては、非酵素的生化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態（カルボニストレス）となり、タンパク質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成されタンパク質を修飾するためであると考えられる(Miyata, T. et al., *Kidney Int.* 55:389-399, (1999))。カルボニルストレスは、単にコラーゲンやフィ

プロネクチンなどのマトリックスタンパク質の構築を変化させるという問題のみならず、カルボニル化合物の持つ各種の細胞に対する生理活性のために、腹膜透過性の亢進・炎症の惹起等にも関係すると考えられる。

腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。そのため腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度の高いカルボニルストレスの状態がもたらされ、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受けて腹膜の機能が低下し、腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる。

実際に、腹膜透析患者において、腹腔内が導入されたグルコースによってカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明された (Yamada, K. et al., Clin. Nephrol., 42: 354-361 (1994)、Nakayama, M. et al., Kidney Int., 51: 182-186 (1997)、Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press、Combet, S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press、Inagi, R. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press)。

#### 発明の開示

本発明は、腹膜透析におけるカルボニル化合物による障害、すなわちカルボニルストレス状態の改善のための方法、並びにこの方法を実現するための透析液や薬剤の提供を課題とする。本発明におけるカルボニル化合物とは、腹膜透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物、腹膜透析液自体がその製造中または保存中に生成したカルボニル化合物、並びに腹膜透析中に腹腔内で生成されるカルボニル化合物が対象となる。これらのカルボニル化合物による透析患者に対する障害を、できるだけ小さくすることが本発明の課題である。

本発明者は、患者の腹腔内に注入された腹膜透析液中に含まれる反応性の高いカルボニル化合物は、もともとの腹膜透析液に由来するものだけではないという

知見を得た。即ち、腹膜透析患者から回収された腹膜透析排液中のグルコース以外のカルボニル化合物は、透析前の5倍となり、増加分は血液由来のカルボニル化合物と考えられた(図1)。このことから、腹腔内の腹膜透析液中のカルボニル化合物は、腹膜透析液の加熱滅菌の過程で生じるカルボニル化合物、あるいは腹膜透析液の保存中に生成・蓄積したカルボニル化合物に加え、血液由来のカルボニル化合物および腹腔内で生成・蓄積するカルボニル化合物の存在も無視できないことがわかった。実際、免疫染色法を用いた腹膜透析患者の腹膜組織の検査においても、カルボニル修飾蛋白が組織内に局在していた(図2)。したがって、腹膜透析に伴い血液より腹腔内に流出するカルボニル化合物をも除去することができれば、カルボニルストレス状態の改善がより一層効果的に行われるものと推測される。

本発明者は、腎不全においては生体内タンパク質修飾を亢進する病態が存在しており、腹膜透析のように腹腔内に持続的に高濃度のグルコースを注入する場合、腹腔内のカルボニル化合物が蓄積した腹膜透析液によって、腹腔タンパク質は一層、非酵素的に修飾を受け易い状態に置かれるのではないかと考えた(図7)。

以上のような背景のもとで、本発明者は腹膜透析液に由来するカルボニル化合物を軽減する透析液を作成するためにカルボニル化合物トラップ剤が有効であることを見出し、本発明を完成した。更に本発明者は、血中に蓄積するカルボニル化合物を重視し、カルボニルストレスによるタンパク質修飾を中心として腹膜透析合併症を阻害することができる薬剤が有用であることを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、カルボニルストレス状態改善剤とそれを応用した腹膜透析液、並びに薬剤に関し、より具体的には、

- (1) カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤、

- (2) カルボニル化合物トラップ剤が、不溶性の担体に固定化されている (1) に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
- (3) カルボニル化合物トラップ剤が、腹膜透析液に混入させるためのものである (1) に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
- (4) カルボニル化合物トラップ剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、またはSH基含有化合物、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される化合物である、(1) ~ (3) のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤、
- (5) カルボニル化合物トラップ剤が、メイラード反応阻害剤である、(1) ~ (3) のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤、
- (6) カルボニル化合物トラップ剤が、カルボニル化合物を吸着することができる腹膜透析液に不溶性の化合物である、(1) に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
- (7) (2) および/または(6) のカルボニル化合物トラップ剤を充填した腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ用カートリッジ、
- (8) (7) に記載のカルボニル化合物トラップ用カートリッジに腹膜透析液を通過させる工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法、
- (9) 次の工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法、
  - a) (2) および/または(6) に記載のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液とを接触させる工程、および
  - b) カルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液を分離する工程
- (10) カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液、
- (11) 第1室および第2室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第1室に還元糖が収容され、第2室にカルボニル化合物トラ

ップ剤が収容されているものである、(10)に記載の腹膜透析液、  
(12)カルボニル化合物トラップ剤が腹膜透析液とともに腹腔内に投与する  
ためのものである、(10)に記載の腹膜透析液、  
に関する。

あるいは本発明は、腹腔内のカルボニルストレス状態改善方法におけるカルボ  
ニル化合物トラップ剤の使用に関する。本発明は、腹膜透析治療におけるカルボ  
ニル化合物トラップ剤の使用にも関する。更に本発明は、カルボニルストレス改  
善剤の製造方法におけるカルボニル化合物トラップ剤の使用に関する。

本発明において、トラップの対象となるカルボニル化合物とは、例えば腹膜透  
析液の製造過程、ならびに保存中に生成するカルボニル化合物を挙げることがで  
きる。先に述べたとおり、浸透圧調節剤としてグルコースを高濃度で含む腹膜透  
析液には、常にカルボニル化合物生成の可能性が伴う。この種のカルボニル化合  
物としては、たとえば以下のような物質が知られている(Richard, J. U. et al.  
, Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984))。

- ・ 3-デオキシグルコソン
- ・ 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-hydroxymethylfurfural、以下5-HMFと省  
略する)
- ・ ホルムアルデヒド
- ・ アセトアルデヒド
- ・ グリオキサール
- ・ メチルグリオキサール
- ・ レブリン酸
- ・ フルフラール
- ・ アラビノース

本発明では、カルボニル化合物トラップ剤を透析施行中を通じて使用すること  
により、腹膜透析液の製造過程や保存中に生成するカルボニル化合物のみならず

、腎不全患者の血中に蓄積し、腹膜透析にともなって腹腔内に輸送される以下のようなカルボニル化合物の除去をも達成することができる。

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

- ・デヒドロアスコルビン酸

炭水化物、脂質、またはアミノ酸に由来するカルボニル化合物：

- ・グリオキサール、
- ・メチルグリオキサール、
- ・3-デオキシグルコソン
- ・ヒドロキシノネナール
- ・マロンジアルデヒド
- ・アクロレイン

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、これら全てのカルボニル化合物に対し、化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させるものであることが望ましいが、これらのカルボニル化合物の中で主要なもののみに対して有効な場合も含まれる。たとえばメチルグリオキサールは、カルボニル化合物の中でも比較的反応性が高いとされており(Thornalley, R.J., *Endocrinol. Metab.* 3: 149-166 (1996)、Inagi, R. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* in press、および実施例3参照)、その活性を奪うことは病態生理学的な意義が大きい。したがって、メチルグリオキサールに対して有効な化合物は、本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤として望ましいと言うことができる。具体的には、実施例にも示すように、活性炭、グアニジン、アミノグアニジン、ヒグアナイド剤、システイン、あるいはアルブミン等の化合物は、メチルグリオキサールに対して特に有効なカルボニル化合物トラップ剤である。

浸透圧調節剤として用いる炭水化物には、グルコースよりも安定性に優れたものも報告されているが、加熱滅菌や保存中にこれらのカルボニル化合物の生成を

完全に抑制することは容易ではない。したがって、グルコース以外の炭水化物を用いる場合であっても、カルボニル化合物トラップ剤の使用には意味がある。グルコース以外に腹膜透析の浸透圧調節剤として用いることが可能な炭水化物には、トレハロース（特開平 7-323084）、加水分解でんぷん（特開平 8-85701）、マルチトールやラクチトール（特開平 8-131541）、あるいは非還元性オリゴ糖や非還元性多糖（特開平 10-94598）等が知られている。

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、カルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物の透析患者に対する障害活性を失わせる化合物、あるいは低下させる化合物であって、その化合物そのものは透析患者に対して安全である物質を用いる。このような化合物には、例えば以下のようなものが知られている。なお、本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、単独で用いるほか、2種類以上の配合剤として使用してもよい。

・アミノグアニジン(Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))

・ $\pm 2$ -イソプロピリデネヒドラゾノ-4-オクソ-チアゾリジン-5-イルアセタニリド( $\pm 2$ -isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide: OPB-9195)(S.Nakamura, 1997, Diabetes. 46:895-899)

さらにカルボニル化合物トラップ剤としては、例えば以下のような化合物またはそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を用いることができる。なお、誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。

(1)メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体（特開昭 62-142114号、特開昭 62-249908号、特開平 1-56614号、特開平 1-83059号、特開平 2-156号、特開平 2-765号、特開平 2-42053号、特開平 6-9380号、特表平 5-505189号）。

(2)スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3)ピラゾロン (特開平6-287179号)、ピラゾリン (特開平10-167965号)、ピラゾール (特開平6-192089号、特開平6-298737号、特開平6-298738号)、イミダゾリジン (特開平5-201993号、特開平6-135968号、特開平7-133264号、特開平10-182460号)、ヒダントイン (特開平6-135968号) などの2個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(4)トリアゾール (特開平6-192089号) などの3個の窒素原子を有する5員複素環式化合物。

(5)チアゾリン (特開平10-167965号)、チアゾール (特開平4-9375号、特開平9-59258号)、チアゾリジン (特開平5-201993号、特開平3-261772号、特開平7-133264号、特開平8-157473号) などの1個の窒素原子と1個の硫黄原子を有する5員複素環式化合物。

(6)オキサゾール (特開平9-59258号) などの1個の窒素原子と1個の酸素原子を有する5員複素環式化合物。

(7)ピリジン (特開平10-158244号、特開平10-175954号)、ピリミジン (特表平7-500811号) などの含窒素6員複素環式化合物。

(8)インダゾール (特開平6-287180号)、ベンゾイミダゾール (特開平6-305964号)、キノリン (特開平3-161441号) などの含窒素縮合複素環式化合物。

(9)ベンゾチアゾール (特開平6-305964号) などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。

(10)ベンゾチオフェン (特開平7-196498号) などの含硫縮合複素環式化合物。

(11)ベンゾピラン (特開平3-204874号、特開平4-308586号) などの含酸素縮合複素環式化合物。

(12)カルバゾイル (特開平2-156号、特開平2-753号)、カルバジン酸



(特開平2-167264号)、ヒドラジン(特開平3-148220号)などの窒素化合物。

(13)ベンゾキノン(特開平9-315960号)、ヒドロキノン(特開平5-9114号)などのキノン類。

(14)脂肪族ジカルボン酸(特開平1-56614号、特開平5-310565号)。

(15)ケイ素含有化合物(特開昭62-249709号)。

(16)有機ゲルマニウム化合物(特開平2-62885号、特開平5-255130号、特開平7-247296号、特開平8-59485号)。

(17)フラボノイド類(特開平3-240725号、特開平7-206838号、特開平9-241165号、WO94/04520)。

(18)アルキルアミン類(特開平6-206818号、特開平9-59233号、特開平9-40626号、特開平9-124471号)。

(19)アミノ酸類(特表平4-502611号、特表平7-503713号)。

(20)アスコクロリン(特開平6-305959号)、安息香酸(WO91/11997)、ピロロナフチリジニウム(特開平10-158265号)などの芳香族化合物。

(21)ポリペプチド(特表平7-500580号)。

(22)ピリドキサミンなどのビタミン類(WO97/09981)。

(23)グルタチオン、システイン、N-アセチルシステインなどのSH基含有化合物。

(24)還元型アルブミンなどのSH基含有蛋白。

(25)テトラサイクリン系化合物(特開平6-256280号)。

(26)キトサン類(特開平9-221427号)。

(27)タンニン類(特開平9-40519号)。

(28)第4級アンモニウムイオン含有化合物。

(29)フェンホルミン、ブホルミン、あるいはメトホルミン等のヒグアニド剤

。

(30)イオン交換樹脂。

(31)活性炭、シリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物。

以上のような化合物には、一般にメイラード反応阻害剤として知られている化合物が含まれる。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応であり、1912年にメイラード (Maillard) がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した (Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912))。このメイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変化、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン (Hb A1c) が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し (Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968))、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。そして、このような生体内のメイラード反応を阻害する物質の探索が精力的に行われ、前述の化合物類がメイラード反応阻害剤として見出された。

しかし、このようなメイラード反応阻害剤が、腹膜透析液や血中由来のカルボニル化合物を排除して腹膜透析患者のカルボニルストレス状態を改善し、カルボニルストレスに起因する腹膜透析合併症を阻害することができるということは、全く知られていなかった。

また、本発明のカルボニル化合物トラップ剤には、前述のメイラード反応阻害剤に代表される有機化合物の他、イオン交換樹脂などの高分子化合物、あるいは活性炭やシリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物も使用できる

。これらの化合物は腹膜透析液に対して不溶性のカルボニル化合物トラップ剤であり、そのカルボニル化合物吸着能を利用してカルボニル化合物をトラップすることができる。これらはクロマトグラフィーの充填剤として知られているものであるが、カルボニルストレス状態の改善に有用であることは知られていない。

従来、活性炭を使用した吸着型血液浄化器が、薬物中毒や肝性昏睡時の血液浄化や、多臓器不全としての急性腎不全発症の初期に増加する内因性・外因性の各種トキシンや血管作動性物質の除去を目的とした血液透析の補助療法として使用されている。しかしながら、かかる吸着型血液浄化器が腹膜透析液中あるいは透析中に腹腔に蓄積するカルボニル化合物の除去に有効であるということは全く知られていなかった。

また、特開昭58-169458号公報には、固体粒子状吸収剤を含有する腹膜透析液および該腹膜透析液を用いた腹膜透析方法に関する発明が記載されている。しかし、同公報によれば、固体粒子状吸収剤は、クレアチニンや低分子量の代謝産物の除去のために添加されており、このものが腹膜透析液中あるいは透析中に腹腔に蓄積するカルボニル化合物の除去に有効であるとする記載は全くない。また、該腹膜透析方法を用いることによって、腹膜透析患者のカルボニルストレス状態が改善されるといったことは、示唆も教唆もされていない。

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤を添加するベースとなる腹膜透析液の組成は、公知のものとすればよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤、緩衝剤、および無機塩類などで構成されている。浸透圧調節剤には先に列挙したような糖類が用いられる。緩衝剤としては、主としてグルコースの安定性を考慮して酸性側(pH5.0-5.4)のpHを与える緩衝系が用いられることが多い。もちろん、浸透圧調節剤にグルコースを加えないものでは、より生理的なpHである7.0前後のpHを与える緩衝剤が利用できる。また、グルコースを用いながら中性域のpHを利用できるように、使用時にpHを調節するための緩衝系を別に包装する商品形態も考案されている。なお、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解

に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域のpHを与える緩衝系を好適に用いることができる。更に腹膜透析液には、通常、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、あるいは塩化マグネシウムのような無機塩類が添加される。これらの塩類は、腹膜透析を生理的な条件に近づけ、生体適合性の向上を期待して添加されるものである。

本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、このような公知の処方に対して、腹膜透析液の配合時に添加し、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理に伴う、これら主成分からのカルボニル化合物の生成に対して予防的な作用を期待できる。また、第1室および第2室からなる分画された容器に腹膜透析液を収容し、第1室に還元糖を収容し、第2室にカルボニル化合物トラップ剤を収容し、使用直前に混合してもよい。この場合、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、混合されたカルボニル化合物トラップ剤と速やかに結合する。そして、腹腔内に投与された後、余剰のカルボニル化合物トラップ剤が血中由来のカルボニル化合物を捕捉する。腹膜透析液に添加されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独であっても良いし、複数種を混合して用いることもできる。

一方、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体や自身腹膜透析液に不溶性のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液との接触方法としては、種々の形態が考えられる。例えば、カルボニル化合物トラップ剤を内部に固定化した容器、あるいは粒子や繊維のような担体に固定したカルボニル化合物トラップ剤入りの容器に腹膜透析液を収容し、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップさせることができる。後者においては、不溶性担体を濾過などによって腹膜透析液から分離することができる。またカルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズ状や繊維状等の担体、あるいは自身が不溶性のカルボニル化合物トラップ剤をカラムに充填してカルボニル化合物トラップ用カートリッジとし、このカートリッジに腹膜透析液を接触させた後に腹腔内に導入することもできる。かか

るカートリッジは、腹膜透析開始時の空気混入を防ぐために、予め蒸留水などを充填しておくのが好ましい。腹腔導入時にカルボニル化合物トラップ用カートリッジに接触させる場合、透析中に蓄積する患者由来のカルボニル化合物を除去することはできないが、透析液中のカルボニル化合物の除去は可能である。あるいは腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、循環回路中にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した前記カルボニル化合物トラップ用カートリッジを設置することにより、腹膜透析液のみならず、透析中に腹腔内に蓄積するカルボニル化合物の除去をも達成することができる。

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、腹膜透析液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限はなく、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。カルボニル化合物トラップ剤を固定化するための担体や自身腹膜透析液に対し不溶性のカルボニル化合物トラップ剤は、公知の修飾、改質または変性などを施すことにより、物質透過性、薬液適合性、保護強度、吸着能力、またはカルボニル化合物に対する特異性を高めることができる。

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などが挙げられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルフォ

ン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせ使用され得る。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にカルボニル化合物トラップ剤が固定化される。固定化されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独で固定化するほか、2種類以上を固定化してもよい。また、上記の高分子材料は、単一のポリマーとして用いられるほか、異種ポリマーとの共重合体とすることもできる。さらに、適当な改質剤を添加したり、放射線架橋、過酸化物架橋などの変性処理を施してもよい。

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などが挙げられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、腹膜透析液との接触面積を制御することができる。更に、腹膜透析液を収容する容器の内壁や、腹膜透析液循環回路の内部などにカルボニル化合物トラップ剤を固定することもできる。

上記担体にカルボニル化合物トラップ剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とカルボニル化合物トラップ剤の間に導入してもよい。カルボニル化合物トラップ剤に毒性がある場合など、担体からの溶出が問題となる場合には、溶出量をできるだけ少なくするためにカルボニル化合物トラップ剤は担体に共有結合で固定化されていることが好ましい。カルボニル化合物トラップ剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデ

ヒド基、カルボキシ基、チオール基、ヒドロキシ基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

カルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体としては、例えば、スルホンヒドラジン基を有するポリスチレン担体 (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIE S社) などの市販のものをを用いることもできる。

本発明に基づくカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体の滅菌は、公知の滅菌法から、カルボニル化合物トラップ剤や担体などの種類により適当な滅菌法が選択される。滅菌処理には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。不溶性のカルボニル化合物トラップ剤や担体に結合されたカルボニル化合物トラップ剤を充填したカートリッジを用意し、これを腹膜透析液を収容した容器に接続した状態で両者を同時に滅菌することもできる。

腹膜透析液と接触するカルボニル化合物トラップ剤が少ないと、腹膜透析液中のカルボニル化合物を十分に除去することができなくなるケースが予想される。一般には腹膜透析中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のカルボニル化合物トラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。カルボニル化合物トラップ剤の用量は、担体へのカルボニル化合物トラップ剤の固定化量、またはカルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。

あるいは、適当な混注用コネクターを装備した腹膜透析回路に、カルボニル化合物トラップ剤を注入することもできる。この場合は、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、回路中で捕捉される。

さらに、カルボニル化合物トラップ剤を直接腹腔内に投与して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。このとき腹膜透析液由来および血中由来のカル

ボニル化合物は、腹腔内で不活性化される。

また、腹膜透析液を患者へ注入する前または腹腔内貯留中に、カルボニル化合物トラップ剤を静脈注射等によって腹膜透析患者体内へ投与することによって、腹腔内のカルボニルストレス状態の改善を図ることもできる。

以下に本発明による腹膜透析液の望ましい実施態様を具体的に示す。

まずベースとなる透析液の組成は、一般的には次のような処方を利用される。これらの処方はあくまでも一般的なものであり、実際には患者の症状に合わせてより適切な組成が採用される。

グルコース	1-5%w/v
ナトリウムイオン	100-150meq
カリウムイオン	0-0.05meq
マグネシウムイオン	0-2meq
カルシウムイオン	0-4meq
塩素イオン	80-150meq
緩衝剤	10-50mM

(乳酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ビルビン酸、コハク酸等の有機酸)

以上のような基本処方に対して、本発明によるカルボニル化合物トラップ剤の有効量を添加する。たとえばアミノグアニジンを添加する場合には、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。添加量が少ない場合には、製造ならびに保存中に発生するカルボニル化合物にカルボニル化合物トラップ剤が消費されてしまい、実際の透析時に患者の血液や組織から透析液に浸出するカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者の血液や組織から浸出するカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のカルボニル化合物トラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。アミノグアニジンは、動物に対し低毒性であることが知られ



ている。「化学物質の毒性効果表(Registry of Toxic Effect of Chemical Substances)」(1978)によれば、アミノグアニジンの半致死量は、ラット皮下注射の場合1258mg/kgであり、マウスでは963mg/kgである。また、水溶性にも優れている。この他OPB-9195の場合も同様に、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。

上記のような処方で配合された本発明による腹膜透析液は、適当な密閉容器に充填し、滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的にはポリ塩化ビニルやポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、腹膜透析液を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装してもよい。

加熱滅菌に代えて、濾過滅菌を施すこともできる。例えば、孔径 0.2 $\mu$ m程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌する。この場合は、加熱に由来するカルボニル化合物の生成を防止することができる。濾過滅菌された腹膜透析液は、可撓性プラスチックバッグなどの容器に充填された後、密封される。滅菌から輸送にいたる一連の処理は、現行の透析液の製造と何ら変わるところは無いので、同様の工程で本発明による腹膜透析液を製造することができる。

高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられるカルボニル化合物トラップ剤が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、腹膜透析液配合時に該カルボニル化合物トラップ剤を予め添加してから、加熱滅菌操作を行うことができる。このようにすれば、加熱時の透析液由来のカルボニル化合物の生成・蓄積を抑制することができる。勿論、保存時や腹膜透析中にも該カルボニル化合物トラップ剤が機能し、カルボニル化合物の生成・蓄積を抑えることができる。

用いるカルボニル化合物トラップ剤が加熱滅菌に安定ではない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。このような滅菌法には、例えば濾過滅菌などがある。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液に、後で該カルボニル化合物トラップ剤を添加してもよい。添加する時期は特に制限されない。例えば、液を滅菌後に該カルボニル化合物トラップ剤を添加すれば、腹膜透析中のみならず、透析前の腹膜透析液保存中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制することができるため好適である。

あるいは、腹膜透析直前または同時に該カルボニル化合物トラップ剤を添加することもできる。例えば、使用直前までベースとなる溶液とカルボニル化合物トラップ剤を前述の軟質プラスチックバッグなどに別々に収容し、腹膜透析開始直前に両者を無菌的に混合する。このためには、特開昭63-19149号に開示されているような剥離可能な接着部により仕切られた可撓性プラスチックバッグが好適に用いられる。

あるいはまた、腹膜透析回路の途中に混注のためのコネクター部材を設け、該コネクターからカルボニル化合物トラップ剤を注入してもよい。

このような腹膜透析液の調製方法は、熱に不安定なカルボニル化合物トラップ剤のみならず、熱に安定なカルボニル化合物トラップ剤に対しても用いることができる。

さらにまた、腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、回路中のいずれかの箇所にカルボニル化合物トラップ剤を充填した濾過器を装置することもできる。

本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液と同様の腹膜透析処置に利用される。すなわち、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このときカルボニル化合物は、クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、血中や

腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。同時に、カルボニル化合物トラップ剤の作用により、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を示す図である。

図 2 は、腹膜透析患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在を示す写真（上段）およびその模式図（下段）である。図中、Aは剥離した中皮細胞下の結合組織中の陽性箇所を表す。Bは肥厚した血管壁の陽性箇所を表す。

図 3 は、グリオキサール、メチルグリオキサール、および 3-デオキシグルコソンを添加した中皮細胞における VEGF mRNA の発現を示す図である。様々な濃度 (0, 100, 200, 400  $\mu$ M) のグリオキサール(A)、3-デオキシグルコソン (B)、およびメチルグリオキサール(C) でインキュベートしたラット中皮細胞培養から抽出した全 RNA の逆転写を行った。VEGF および G3PDH cDNA を、それぞれ 30 および 21 サイクルの PCR により増幅した。3 連で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNA に対する VEGF mRNA の比を計算した。実験は 3 回行い、その平均  $\pm$  S.D. をグラフにした。\* $P < 0.0005$ 。

図 4 は、メチルグリオキサール添加による微小血管内皮細胞における VEGF 蛋白質の産生を示す図である。ヒト微小血管内皮細胞を様々な濃度 (0, 200, 400  $\mu$ M) のメチルグリオキサールの存在下で培養し、ELISA により培養上清中に放出される VEGF 蛋白質を定量した。3 回の実験の代表的な結果を示す。データは平均  $\pm$  range で表した。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。

図 5 は、メチルグリオキサールを添加した内皮細胞における VEGF mRNA の発現を示す図である。ヒト内皮細胞を様々な濃度 (0, 100, 200, 400  $\mu$ M) のメチルグリオキサールの存在下で培養し、全 mRNA を抽出後に逆転写反応を行った。VEGF および G3PDH cDNA を、それぞれ 30 および 21 サイクルの PCR により増幅した。3 連

で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNA に対する VEGF mRNA の比を計算した。実験は3回行い、その平均±S.D.をグラフにした。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.005$ 、\*\*\* $P < 0.0001$ 。

図6は、10日間、毎日メチルグリオキサールを腹腔内投与したラット腹腔組織でのVEGF mRNA の発現を示す図である。腹膜でのVEGFおよびG3PDH mRNA の発現を、それぞれ 28 および 16 サイクルのRT-PCRにより増幅した。3連で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNAに対するVEGF mRNA の比を計算した。実験は3回行い、その平均±S.D.をグラフにした。\* $P < 0.05$ 。

図7は、腹膜透析患者の腹腔内でのカルボニルストレスを表す図である。

図8は、腹膜透析排液インキュベーションによるペントシジン生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図9は、腹膜透析排液インキュベーションによるプロテインカルボニル生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図10は、3人の腹膜透析患者（患者I、患者Sおよび患者K）の腹膜透析(CAPD)排液中のカルボニル化合物量に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図11は、酸性環境における腹膜透析液中の5-HMF生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図12は、中性環境における腹膜透析液中の5-HMF生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図13は、酸性および中性環境における腹膜透析液中のカルボニル化合物量に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

図14は、腹膜透析液へのカルボニル化合物トラップビーズ添加によるペントシジン生成抑制効果を示す図である。

図15は、腹膜透析液へのカルボニル化合物トラップビーズ添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

図16は、ジカルボニル溶液への活性炭添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

図17は、腹膜透析液への活性炭添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

図18は、グアニジンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図19は、ヒグアニド剤にメトホルミン (Metformin) を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図20は、ヒグアニド剤にブホルミン (Buformin) を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図21は、ヒグアニド剤にフェンホルミン (Phenformin) を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図22は、アミノグアニジンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図23は、SH化合物にシステインを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図24は、SH化合物にN-アセチルシステインを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図25は、SH化合物にGSHを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図26は、SH化合物にアルブミンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

図27は、腹膜透析液にSH化合物を添加したときのペントシジンの生成抑制効果を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

#### 【実施例1】 腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量の測定

腹腔内におけるカルボニルストレスの発生を証明するため、以下の実験方法に従い、腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を測定した。

##### 1) カルボニル化合物の測定

腹膜透析液（バクスター製、ダイアニールPD-2 2.5）および腹膜透析患者に前記の腹膜透析液を投与し腹腔内に一夜貯留後の腹膜透析排液をそれぞれ400 $\mu$ L採り、1.5mMの2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNPH）（和光純薬製）を0.5N塩酸溶液400 $\mu$ Lと混合後、30分間室温で攪拌し、液中のカルボニル化合物と2,4-DNPHを反応させた。次に1Mのアセトン水溶液40 $\mu$ Lを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の2,4-DNPHをアセトンと反応させて除去した後、400 $\mu$ Lのn-ヘキサンで3回洗浄し、水層について360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250）で測定した。

##### 2) 検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1)と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

##### 3) カルボニル化合物の定量

腹膜透析液および腹膜透析排液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコース CII-テストワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物の量を求めた。液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量と

した。

得られた結果を図1に示す。腹腔内に一夜貯留された後の腹膜透析排液では、投与前の腹膜透析液と比較してカルボニル化合物量は約5倍となり、血中から腹腔内へのカルボニル化合物の移行が示された。

【実施例2】 腹膜透析液患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在  
腹膜透析患者の腹膜組織中のカルボニル化合物をマロンジアルデヒドを指標とした免疫染色法により調査した。

腹膜透析患者（50歳男性、腹膜透析歴5年）の腹膜組織について、Horieらの方法（Horie, K. et al., J. Clin. Invest., 100, 2995-3004(1997)）に従い、一次抗体としてマウス抗マロンジアルデヒドモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、剥離した中皮細胞下の結合組織および肥厚した血管壁に強い陽性所見を認めた（図2）。

マロンジアルデヒド（MDA）は過酸化脂質の分解により生成するカルボニル化合物である。そこで、MDA以外の過酸化脂質分解生成物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール、および糖酸化反応の結果生成するカルボキシメチルリジンやペントシジンに対する抗体を用いて、同様に免疫染色を行った結果、図2で示された陽性部位と同様の箇所が陽性であった。このことから、腹膜透析患者の腹膜組織は、過酸化脂質分解生成物および糖酸化生成物由来のカルボニル化合物に起因するカルボニルストレスの亢進により、蛋白修飾を受けていることが分かった。

【実施例3】 メチルグリオキサールによる腹膜細胞障害

長期間の腹膜透析による腹膜の限外濾過機能の低下は、拡散による物質交換が可能な腹膜の表面積の増加を証拠付けるものである（Krediet, R.T., 1999, Kidney Int. 55: 341-356; Heimbürger, O. et al., 1990, Kidney Int 38: 495-506; Imholz, A.L. et al., 1993, Kidney Int. 43: 1339-1346; Ho-dac-Pannekeet, M.M. et al., 1997, Perit. Dial. Int. 17: 144-150)。すなわち、腹膜透析液中のグルコースが拡散し腹腔内から流出することにより浸透圧勾配による透析

機能が低下する。これは、腹膜内の血管表面積の増加により説明することも可能である。そしてこの病態には、血管内皮増殖因子 (VEGF) が重要な役割を果たすと考えられる。VEGFは血管の透過性を亢進し (Senger, D.R. et al., 1983, *Science* 219: 983-985; Connolly, D.T. et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 20017-20024)、NOの合成を刺激し血管を拡張させ (Hood, J.D. et al., 1998, *Am. J. Physiol.* 274: H1054-1058)、炎症反応を誘導する (Clauss, M. et al., 1990, *J. Exp. Med.* 172: 1535-1545; Melder, R.J. et al., 1996, *Nat. Med.* 2: 992-997)。また、VEGFは強力な血管新生因子であり、血管傷害を回復させる機能を持つ (Thomas, K.A., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 603-606; Ferrara, N. et al., 1997, *Endocr. Rev.* 18: 4-25; Shoji, M. et al., 1998, *Am. J. Pathol.* 152: 399-411)。そこで、透析液に含まれるグルコース分解産物がVEGF産生に及ぼす効果を検証した。

### < 3 - 1 > グルコース分解産物の存在下での腹膜中皮および血管内皮細胞培養における VEGF の発現

6週齢の雄CD (SD) IGSラット (Charles-River, Kanagawa, Japan) より腹膜を採取した。中皮細胞は Hjelleらの方法 (Hjelle, J.T. et al., 1989, *Perit. Dial. Int.* 9: 341-347) に基づいて単離し、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) にて培養した。7~10継代目の中皮細胞を、様々な濃度のグルコース分解産物 (グリオキサール、メチルグリオキサール (Sigma, St. Louis, MO)、または 3-デオキシグルコソン (Fuji Memorial Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Kyoto, Japanより供与)) の存在下、CO<sub>2</sub> インキュベータで3時間培養した。VEGF mRNA の発現の解析は、半的量的RT-PCRにより行った。Rneasy Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて中皮細胞から全RNAを単離した。RNA 5 $\mu$ gをオリゴ (dT)<sub>12-18</sub>プライマー (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) と200 unitsのRNase Hフリーの逆転写酵素 (Superscript II: Gibco BRL) を用いて逆転写し、PCR増幅を以前記載した条件にて行った (Miyata, T. et al., 1994,



J. Clin. Invest. 93: 521-528)。用いたオリゴヌクレオチドプライマー配列は、ラットVEGFの増幅に使用したプライマーについては 5'-ACTGGACCCTGGCTTTACTGC-3' (配列番号: 1) および 5'-TTGGTGAGGTTTGATCCGCATG-3' (配列番号: 2) で、310bpの増幅産物を得た。ラットグリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G3PDH) の増幅に使用したプライマーは 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGCCC-3' (配列番号: 3) および 5'-GATGTCATCATATTTGGCAGGTT-3' (配列番号: 4) であり、322bpの断片を増幅した。G3PDHはRNAの内部標準として使用し、異なる試料間でのRNAレベルの比較を行った。各試料は DNA Thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) を用いて、94°C 0.5分、60°C 1分、72°C 1.5分の条件で、まず適当なサイクル数を決定した。予備的な実験として、逆転写およびPCR増幅を様々なRNA量を用いて、16、18、21、25、28、31、および34サイクルの条件で行った。その結果、VEGF mRNA の増幅では30サイクル、G3PDH mRNA の増幅では21サイクルの条件で、加えたRNAと定量的に相関したPCR産物のシグナルが得られた。PCR産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、定量プログラム (NIH image) でシグナル強度を測定して定量化した。実験は、それぞれのグルコース分解産物濃度において行った。3連の実験で mRNA を定量し、各実験の平均を求めた。計3~4回の独立した実験を各実験条件にて行った。結果は平均をとり、平均±S.D.で表した。分散分析 (ANOVA) により統計的有意性を評価した。この分析により有意な違いが示された場合は、Scheffeの t 検定により、異なるメチルグリオキサール濃度で得られた結果を比較した。

0~400 $\mu$ Mの様々な濃度において、グリオキサールや 3-デオキシグルコソンはVEGFの発現を変化させなかった (図3AおよびB)。メチルグリオキサールのみが、400 $\mu$ Mの濃度で VEGF mRNA の発現を刺激した ( $P<0.0005$ ) (図3C)。逆転写を行わなかったRNA試料からはPCR産物は生成されなかった。すべての細胞は生存可能であった。中皮細胞を高濃度の 3-デオキシグルコソン (0.625, 2.5, および 5mM) の存在下で培養したところ、細胞の生存率の低下が見られた (細胞生存率は、0

.625, 2.5, 5mM の 3-デオキシグルコソン存在下において、それぞれ 80, 55, 8 %であった)。細胞の生存率が低下したため、VEGF mRNA 発現の測定はできなかった。これらの観察結果から、メチルグリオキサールのみを以下の実験に用いた。

様々な濃度のメチルグリオキサール存在下で 24時間培養したヒト微小血管内皮細胞の培養上清中へのVEGF蛋白質の放出を、ELISAにより測定した。ヒト微小血管内皮細胞はクラボー (Osaka, Japan) より購入し、VEGF欠失EGM-2培地 (Takara, Tokyo, Japan) で培養した。メチルグリオキサールとのインキュベートは上記のラット腹膜中皮細胞と同様に行った。VEGF蛋白質は、2連で調製した培養上清に対し、キット (Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, USA) を用いて添付の説明書に従い、酵素結合免疫ソルベントアッセイ (ELISA) により定量化した。実験は3回繰り返し、結果を上記と同様に統計解析した。

その結果、培地中へのメチルグリオキサールの添加により、用量依存的にVEGFの増加が認められた (図4)。メチルグリオキサール非存在下では、VEGFの放出は検出されなかった。すなわち、蛋白質レベルでも、メチルグリオキサールの用量依存的にVEGF産生・放出が刺激されることが示された。

次に、様々な濃度 (0~400 $\mu$ M) のメチルグリオキサール存在下で培養した内皮細胞の VEGF mRNA の発現を調べた。実験はラット中皮細胞の場合と同様に行った。ただし、ヒトVEGFの増幅には 5'-GGCAGAATCATCACGAAGTGCTG-3' (配列番号: 5) および5'-CTGTAGGAAGCTCATCTCTCC-3' (配列番号: 6) のプライマーを使用し、増幅された断片は271bpであった。ヒト G3PDH の増幅にはラットと同じプライマーを使用した。解析の結果、VEGF mRNA の発現は用量依存的に増加することが判明した (図5)。

<3-2> メチルグリオキサールを腹腔内投与されたラットの腹膜組織における VEGF発現

メチルグリオキサールが腹膜における VEGF mRNA の発現に及ぼす生物学的影響をさらに in vivo 系にて調べるため、ラットの腹腔に様々な量のメチルグリオ

キサールを 10日間投与する実験を行った。6週齢の雄CD (SD) IGSラットに、様々な濃度のメチルグリオキサールを含む生理食塩水 50ml/kg を10日間、毎日腹腔内に投与した。腹壁から腹膜を単離しVEGF mRNA の発現を調べた。実験は上記ラット中皮細胞の *in vitro* 実験と同様に行った。ただし、腹膜組織からのmRNA の抽出には ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いた。またPCR増幅は、VEGF mRNA の増幅では28サイクル、G3PDH mRNA の増幅では16サイクルの条件で行った。

図6に示すように、メチルグリオキサール濃度により、腹壁腹膜試料のVEGF mRNA 発現は有意に上昇した ( $P<0.05$ )。光学顕微鏡観察では、腹膜組織に変化は見られなかった (血管数、血管壁、間隙、および中皮細胞は正常であった)。

### < 3-3 > 長期腹膜透析患者の腹膜組織の VEGFおよびカルボキシメチルリジン (CML)の免疫染色

腹膜透析患者9名の腹膜組織における VEGFおよびカルボキシメチルリジンの分布を免疫組織化学分析により調べた。カルボキシメチルリジンは、グリオキサールや 3-デオキシグルコソンなどのグルコース分解産物に由来する (Miyata, T. et al., 1999, *Kidney Int.* 55: 389-399)。従って、抗カルボキシメチルリジン抗体は、グルコース分解産物で修飾された蛋白質に対するマーカーとして用いられる。

インフォームドコンセントを得た後、カテーテル再挿入時に9人の非糖尿病腹膜透析患者より腹膜組織を単離した (表1)。カテーテル再挿入の必要性は、カテーテルの損傷、位置のずれ、および/または閉塞による生じたものである。腹膜炎患者はいなかった。腎機能が正常な男性2名 (48および58歳) から、腹部切開時に正常な腹膜組織を単離した。

2 $\mu$ 厚の腹膜組織切片を、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (Sigma)をコートしたスライドにマウントし、脱パラフィン後、蒸留水を通してから、Pronase (0.5mg/ $\mu$ l:Dako, Glostrup, Denmark) を含むバッファー溶液 (0.05M Tris-HC

1 (pH7.2), 0.1M NaCl) で室温で 15分インキュベートした。スライドは、0.5% Tween20を含むPBSで洗浄し、4%スキムミルクで 2時間ブロッキングを行った後、抗VEGFウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、または抗AGEマウスIgG (Ikeda, K. et al., 1996, Biochemistry 35: 8075-8083) (カルボキシメチルリジンをエпитープとする: Miyata, T. et al., 1997, Kidney Int. 51: 1170-1181) で一晩、4°Cにて、ヒューミッドチェンバー中でインキュベートした。切片を洗浄後、1:100 希釈のペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG またはペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG (Dako) で2時間室温でインキュベートし、0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 3,3'-ジアミノベンジジン溶液でシグナルを検出した。また、過ヨウ素酸-シッフ染色により組織学的分析を行った。免疫染色は2人で独立に観察して、シグナル強度と分布の評価を行った。

結果は表1に示した。表中「正常1」および「正常2」は腎機能が正常な被験者由来の試料、「PD1」～「PD9」は腹膜透析患者由来の試料を表す。代表的な長期腹膜透析患者の腹膜組織像(表1のPD6)の観察では、間質性のフィブローシス、血管壁の肥厚およびヒアリン症が認められた。中皮細胞および血管壁には、VEGFとカルボキシメチルリジンが共局在していた。中皮層では、VEGFのシグナルはカルボキシメチルリジンのシグナルよりも弱かった。結果は、他の8人の患者でも同様であった。正常な腹膜試料(表1の正常2)では、腹膜透析試料に比べ、VEGFは血管壁にしか存在しておらず、中皮層では検出されなかった。カルボキシメチルリジンは中皮層では検出されず、血管壁のシグナルも極弱いものであった。これらの観察は他の対照正常試料でも同様であった。正常マウスIgGを用いた場合は、免疫染色は検出されなかった。このように、腹膜透析患者においてのみ、中皮でのVEGF発現とカルボキシメチルリジンの共局在が見られる事実は、腹膜透析により、腹膜透析液中のグルコース分解産物が、尿毒症患者において実際に VEGF産生を増強していることを示唆している。

表 1 腹膜透析患者腹膜組織におけるCMLおよびVEGFの免疫組織化学的検出

試料	性別	年齢 (歳)	腹膜透析期間 (月)	CML		VEGF	
				中皮層	血管壁	中皮層	血管壁
正常1	M	48	—	—	±	—	+
正常2	M	58	—	—	±	—	+
PD1	F	53	3	+	+	+	+
PD2	M	44	4	+	+	+	+
PD3	M	43	45	+	+	+	+
PD4	F	54	60	++	++	++	+
PD5	M	52	70	++	++	+	+
PD6	M	51	90	++	++	++	++
PD7	M	45	105	++	++	++	++
PD8	M	62	108	++	++	++	++
PD9	M	66	110	++	++	++	++

—：陰性、±：極弱いシグナル、+：陽性、++：強く陽性

以上の結果は、腹膜透析患者が、腹膜透析液中のグルコース分解産物等によりカルボニルストレス状態に置かれていることを裏付けるものであり、更に、メチルグリオキサールが腹膜細胞でVEGFの産生を増強することを初めて実証するものである。腹膜透析液に含まれるグルコース分解産物が腹膜の透過性を低下させる原因の少なくとも一部は、VEGF産生の亢進とそれに伴う血管新生の刺激によるものであることが示唆される。

【実施例4】 腹膜透析患者の透析液排液に対するカルボニル化合物トラップ剤の添加効果

<4-1>

ペントシジンはAGEの構造体の1つであり、腎不全患者の血中には健常人と比較して約20倍の蓄積が認められている (Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206 (1996))。腹膜透析患者の排液を37°Cでインキュベートした場合に増加するペントシジンおよびタンパク質上に存在するカルボニル基 (プロテインカルボニル) に対するアミノグアニジンの添加効果の検討を行った。

腹膜透析患者の一夜貯留排液を遠心後、上清を濾過滅菌 (孔径 0.45  $\mu$ m) し、ア

ミノグアニジン（東京化成製）を0、1、10、100 mMの濃度になるように添加し、37°Cでインキュベートした。インキュベート期間は、ベントシジンを測定する場合は1乃至2週間、プロテインカルボニルを測定する場合は2週間とした。ベントシジンの測定は、6N HCl中110°Cでタンパク質を加水分解した後、HPLC（島津製作所製、LC-10A）で定量した（T.Miyataら,1996,J.Am.Soc.Nephrol,7:1198-1206, T.Miyataら,1996,Proc.Natl.Acad.Aci.USA, 93:2353-2358）。プロテインカルボニルの測定は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)(和光純薬製)と反応させた後、カルボニル基と反応して生成したヒドラゾンの吸光度を測定(日本モレキュラーデバイス製、SPECTRAMax 250)することにより行った（Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233, 346-357 (1994)）。

その結果、ベントシジンの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた（図8）。同様に、プロテインカルボニルの生成に対しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた（図9）。

#### < 4-2 >

次に、以下の実験方法に従い、腹膜透析患者の一夜貯留排液中のグルコース以外のカルボニル化合物量に対するアミノグアニジンの添加効果を検討した。

##### (A)腹膜透析排液のインキュベーション

腹膜透析施行患者の排液を採取し、孔径 0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過した後、アミノグアニジン（東京化成製）を0、10、50および250mMの濃度となるように加え、試料溶液とした。試料溶液 1mlを採り、スクリーキャップ付プラスチックチューブに分注した後、37°Cで 15時間インキュベートした。なお、試料溶液は、インキュベーション直前まで、-30°Cで保存した。

##### (B)カルボニル化合物の定量

###### 1) 試料溶液の測定

試料溶液400 $\mu$ Lを採り、1.5mMの 2,4-DNPH（和光純薬製）を 0.5N塩酸溶液 400 $\mu$ Lと混合後、30分間室温で攪拌し、試料溶液中のカルボニル化合物と 2,4-DNP

Hを反応させた。次に、1Mのアセトン水溶液 40  $\mu$ Lを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の 2,4-DNPH をアセトンと反応させて除去した後、試料溶液を 400  $\mu$ Lの n-ヘキサンで3回洗浄し、水層について 360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250）で測定した。

## 2) 検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1)と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

## 3) カルボニル化合物の定量

試料溶液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコースCII-テストワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物量を求めた。腹膜透析排液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量とした。

その結果を図10に示す。腹膜透析患者の腹膜透析液排液中のグルコース以外のカルボニル化合物量は、インキュベートしないものおよび37°Cで15時間のインキュベートをしたもの共に、アミノグアニジンの濃度が増加するに従い減少した。

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を腹膜透析液に添加、あるいは患者に投与することが、腹腔内に注入された腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制するために有効であることが明らかとなった。それにより、腹腔内に存在する腹膜透析液由来および血中由来のカルボニル化合物が除去され、腹膜透析患者のカルボニルストレス状態が改善される。

【実施例5】 腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるカルボニル化合物トラップ剤の添加効果

腹膜透析液中には、浸透圧調節剤として、高濃度(1.35~4.0 w/v%)のグルコースが含まれている。グルコースは熱に対して不安定で、加熱滅菌や保存中に分解する。グルコースの分解物として、5-ヒドロキシメチルフルフラール(5-hydroxymethylfurfural;5-HMF)、レブリン酸、アセトアルデヒドなどが生成することが

報告されている (Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853(1984)、Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993))。腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるアミノグアニジンのカルボニル化合物の生成抑制効果を5-HMF、カルボニル化合物量を測定することにより検討した。なお、グルコースの分解の程度は液のpHの影響を受けることから、滅菌前のpHが酸性 (pH5.3) および中性 (pH7.0) の2種類の腹膜透析液を調製し、実験に供した。滅菌温度は121°Cとした。

#### < 5-1 >

5-HMFの測定は、高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製、LC-10A)を用いて、測定した (Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993))。

その結果、酸性環境 (図11) および中性環境 (図12) 共に、5-HMFの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた。

#### < 5-2 >

腹膜透析液中のカルボニル化合物の定量は、実施例1と同様に 2,4-DNPHと反応させた後、吸光度を測定することにより行った (Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233: 346-357(1994))。滅菌温度は121°Cとした。

その結果、カルボニル化合物量に関しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた (図13)。

これらの結果から、腹膜透析液中にカルボニル化合物の生成を抑える薬剤を添加することが、腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および/または蓄積を抑制するために非常に有効であることが明らかとなった。

〔実施例6〕 腹膜透析液中のペントシジン生成に対するカルボニル化合物トラップビーズの添加効果

架橋したポリスチレン樹脂にスルホニルヒドラジン基を結合したもの (PS-TsNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES社) をカルボニル化合物トラップビーズとして用いて、腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。腹膜透析液及びカ



ルボニル化合物トラップビーズを添加した腹膜透析液を37°Cでインキュベートし、ベントシジンの形成抑制効果を確認した。カルボニル化合物トラップビーズの入ったチューブに、ジメチルスルホキシド100 $\mu$ lを加え膨潤させた後、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニール PD-4,1.5）800 $\mu$ L、水に溶解した150mg/mL濃度のウシ血清アルブミン200 $\mu$ Lを添加し、37°Cで1週間インキュベートした。インキュベート終了後、ポアサイズ0.22 $\mu$ mの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）を用いてビーズを除去した。つぎに、ビーズを除去した溶液50 $\mu$ lに10%トリクロル酢酸 50 $\mu$ lを加え、遠心して蛋白を沈殿させた。蛋白を300 $\mu$ lの5%トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。つぎに、6N HClを100 $\mu$ l添加し、110°Cで16時間加熱した後、HPLCでベントシジンを定量した（T. Miyataら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, T. Miyataら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 93: 2353-2358）。

37°Cでインキュベートしたときに生成するベントシジン量を図14に示した。カルボニル化合物トラップビーズの添加により、ベントシジンの生成が著しく抑制されることが判明した。

〔実施例7〕 腹膜透析液中のカルボニル化合物量に対するカルボニル化合物トラップビーズの添加効果

カルボニル化合物トラップビーズによる腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。カルボニル化合物トラップビーズ（PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES社）の入ったチューブに、ジメチルスルホキシド100 $\mu$ lを加え膨潤させた後、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニール PD-4,1.5）900 $\mu$ Lを添加し、ローテーターを用いて室温で16時間攪拌した。次に、カルボニル化合物トラップビーズの入った懸濁液を、ポアサイズ0.22 $\mu$ mの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、濾液中のカルボニル化合物量を以下のようにして測定した。

<カルボニル化合物の定量>

### 1) 試料溶液の測定

試料溶液200 $\mu$ Lと、2,4-DNPHを0.5N塩酸に溶かした溶液(0.025%)200 $\mu$ Lを混合後、30°Cで30分間反応させた。次に、1Mのアセトン水溶液20 $\mu$ Lを添加し、30°Cで10分間インキュベートした後、200 $\mu$ Lのn-ヘキサンで3回洗浄した。さらに、水層に200 $\mu$ Lのオクタノールを加えてヒドラゾンを抽出し、オクタノール層について360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計(日本モレキュラーデバイス製SPECTRAMax250)で測定した。

### 2) 検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1)と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

### 3) カルボニル化合物量の定量

試料溶液中のグルコース濃度をグルコース測定キット(和光純薬製、グルコースCII-ワコー)を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物量を求めた。試料溶液中の総カルボニル化合物量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、試料溶液中のカルボニル化合物の量とした。

その結果を図15に示す。腹膜透析液に2mgのカルボニル化合物トラップビーズを添加し、室温で16時間攪拌することにより、カルボニル化合物量は55%減少した。また、添加するカルボニル化合物トラップビーズの量を10mgまで増加させた場合、カルボニル化合物量はさらに減少した。。

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を用いて、腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および/または蓄積を抑制できることが明らかとなった。

【実施例8】 活性炭によるジカルボニル溶液中のカルボニル化合物トラップ作用

カルボニル化合物トラップ剤として活性炭を用い、ジカルボニル溶液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。活性炭(和光純薬工業製)25 $\mu$ gまたは5

0  $\mu$ gを入れたチューブに、ジカルボニル化合物をリン酸緩衝液（以下PBSと省略する）に溶解したジカルボニル溶液（いずれも 100  $\mu$ M）をそれぞれ 900  $\mu$ l 分注した。ジカルボニル化合物としては、グリオキサール、メチルグリオキサール、および3-デオキシグルコソンを用いた。このチューブをローテーターにセットして室温で 19 時間攪拌した。攪拌後、チューブ内の溶液をポアサイズ 0.22  $\mu$ m の遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、各ジカルボニル化合物の濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。測定方法は、公知の方法に従った。

結果は図 16 に示した。900  $\mu$ l のジカルボニル溶液に活性炭 25  $\mu$ g を添加した場合、グリオキサール(GO)で71%、メチルグリオキサール(MGO)で94%、そして3-デオキシグルコソン(3DG)では93%が活性炭によってトラップされていた。活性炭を 50  $\mu$ g 用いた場合には、グリオキサールで85%、メチルグリオキサールや3-デオキシグルコソンでは98%と、試験した全てのジカルボニル化合物の大部分が活性炭によってトラップされることが確認できた。

【実施例 9】 活性炭による腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ作用

カルボニル化合物トラップ剤として活性炭を用い、腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。活性炭（和光純薬工業製）25  $\mu$ g または 50  $\mu$ g を入れたチューブに、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニールPD-4,1.5、商品名）を 900  $\mu$ l 分注した。このチューブをローテーターにセットして室温で 19 時間攪拌した。攪拌後、チューブ内の腹膜透析液をポアサイズ 0.22  $\mu$ m の遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、濾液に含まれるグリオキサール、メチルグリオキサール、および3-デオキシグルコソンの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。測定方法は、公知の方法に従った。

結果は図 17 に示した。900  $\mu$ l の腹膜透析液に活性炭 25  $\mu$ g を添加した場合、活性炭を加えない腹膜透析液に対して、グリオキサール(GO)で56%、メチルグリオキサール(MGO)で71%、そして3-デオキシグルコソン(3DG)では62%が活性炭に

よってトラップされていた。活性炭を50  $\mu$ g用いた場合には、グリオキサールで64%、メチルグリオキサールで78%、そして3-デオキシグルコソンでは77%のジカルボニル化合物が活性炭によってトラップされることが確認できた。

〔実施例10〕 グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するグアニジン、アミノグアニジン、ビグアナイド剤のトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50  $\mu$ l、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400  $\mu$ l、30mMのグアニジン、アミノグアニジン、またはビグアナイド剤溶液50  $\mu$ lを混合し、37°Cでインキュベートした。ビグアナイド剤には、メトホルミン（metformin）、ブホルミン（buformin）、およびフェンホルミン（phenformin）を用いた。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを、o-フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

結果は図18（グアニジン）、図19（メトホルミン）、図20（ブホルミン）、図21（フェンホルミン）、図22（アミノグアニジン）に示した。グアニジン、アミノグアニジン、および、いずれのビグアナイド剤も、特にメチルグリオキサールの濃度を顕著に低下させる効果が確認された。またアミノグアニジンにおいては、メチルグリオキサールに対して劇的に濃度を低下させ、更にその他のビグアナイドでは顕著な濃度低減作用が見られなかった3-デオキシグルコソンに対しても濃度を著しく低下させている。

〔実施例11〕 グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するSH剤のトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50  $\mu$ l、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400  $\mu$ l、30mMのSH化合物溶液50  $\mu$ lを混合し、37°Cでインキュベートした。インキュベートした。SH化合物には、システイン（cystein）、N-アセチルシステイン（N-acetylcysteine）、および GSH

を用いた。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを $\alpha$ -フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

結果は図23（システイン）、図24（N-アセチルシステイン）、および図25（GSH）に示した。いずれのSH化合物にも、グリオキサールとメチルグリオキサールの両方に対して、顕著に濃度を低下させる作用が確認された。

【実施例12】 グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するアルブミンのトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50 $\mu$ l、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400 $\mu$ l、100mg/mlのウシ血清アルブミン溶液50 $\mu$ lを混合し、37°Cでインキュベートした。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを $\alpha$ -フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

結果は図26に示した。ウシ血清アルブミンには、グリオキサールとメチルグリオキサールの濃度を顕著に低下させる作用が確認された。

【実施例13】 腹膜透析液にSH化合物を添加し、37°Cでインキュベートしたときのペントシジンの生成抑制効果

腹膜透析液（バクスター製 PD-4,1.5）490 $\mu$ l、SH化合物を0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）に溶かした液70 $\mu$ l、ウシ血清アルブミンを腹膜透析液（バクスター製 PD-4,1.5）に30mg/mlとなるように溶かした液140 $\mu$ lを混合し、37°Cで1週間インキュベートした。SH化合物には、システイン(cystein)、N-アセチルシステイン(N-acetylcysteine)、GSH、およびアミノグアニジンを用いた。インキュベート終了後、溶液50 $\mu$ lに10%トリクロル酢酸50 $\mu$ lを加え、遠心して蛋白を沈殿させた。蛋白を300 $\mu$ lの5%トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。次に、6N HClを100 $\mu$ l添加し、110°Cで16時間加熱した後、高速液体クロマトグラフィーでペン

トシジン定量した (T.Miyataら、1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7:1198-1206, T.Miyataら、1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93:2353-2358)。

結果は図 27 に示した。SH 化合物の添加によって、ペントシジンの生成量が顕著に抑制されることが確認できた。

### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、腹膜透析において患者を苦しめていたカルボニル化合物による障害を、簡単に取り除くことができる。公知の腹膜透析液においては、製造中に生じたカルボニル化合物とともに、透析によって生体内から腹腔中に浸出したカルボニル化合物により、透析患者の腹膜は常にカルボニルストレスの状態に置かれていた。これに対して本発明では、腹膜透析液中に生成するカルボニル化合物を効果的に除去することができるので、透析患者のカルボニルストレス改善に貢献する。更に、カルボニル化合物トラップ剤の腹腔内への導入、あるいはカルボニル化合物トラップ用カートリッジへの透析液の循環によって、腹腔中に浸出したカルボニル化合物をも効果的に不活性化、あるいは除去することができる。このように、本発明は腹膜透析に伴うカルボニル化合物に起因する腹膜障害を含む腹膜透析に起因する障害の対策として非常に有効なアプローチを提供するものである。

また、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域の pH を有する腹膜透析液を提供することができ、より生理的な腹膜透析療法が可能となる。

本発明の腹膜透析液は、カルボニル化合物トラップ剤との接触あるいは投与といった簡単な操作のみで実施することができ、特殊な製造設備も要求しない。したがって、本発明によるカルボニル化合物トラップ剤とそれを利用した腹膜透析液、ならびにその製造方法は、腹膜透析治療における新しい治療概念を生み出す

ものである。

## 請求の範囲

1. カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤。
2. カルボニル化合物トラップ剤が、不溶性の担体に固定化されている請求項 1 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
3. カルボニル化合物トラップ剤が、腹膜透析液に混入させるためのものである請求項 1 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
4. カルボニル化合物トラップ剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ヒグアナイド化合物、または S H 基含有化合物、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される化合物である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤。
5. カルボニル化合物トラップ剤が、メイラード反応阻害剤である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤。
6. カルボニル化合物トラップ剤が、カルボニル化合物を吸着することができる腹膜透析液に不溶性の化合物である、請求項 1 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
7. 請求項 2 および／または請求項 6 のカルボニル化合物トラップ剤を充填した腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ用カートリッジ。
8. 請求項 7 に記載のカルボニル化合物トラップ用カートリッジに腹膜透析液を通過させる工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法。
9. 次の工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法。
  - a) 請求項 2 および／または請求項 6 に記載のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液とを接触させる工程、および

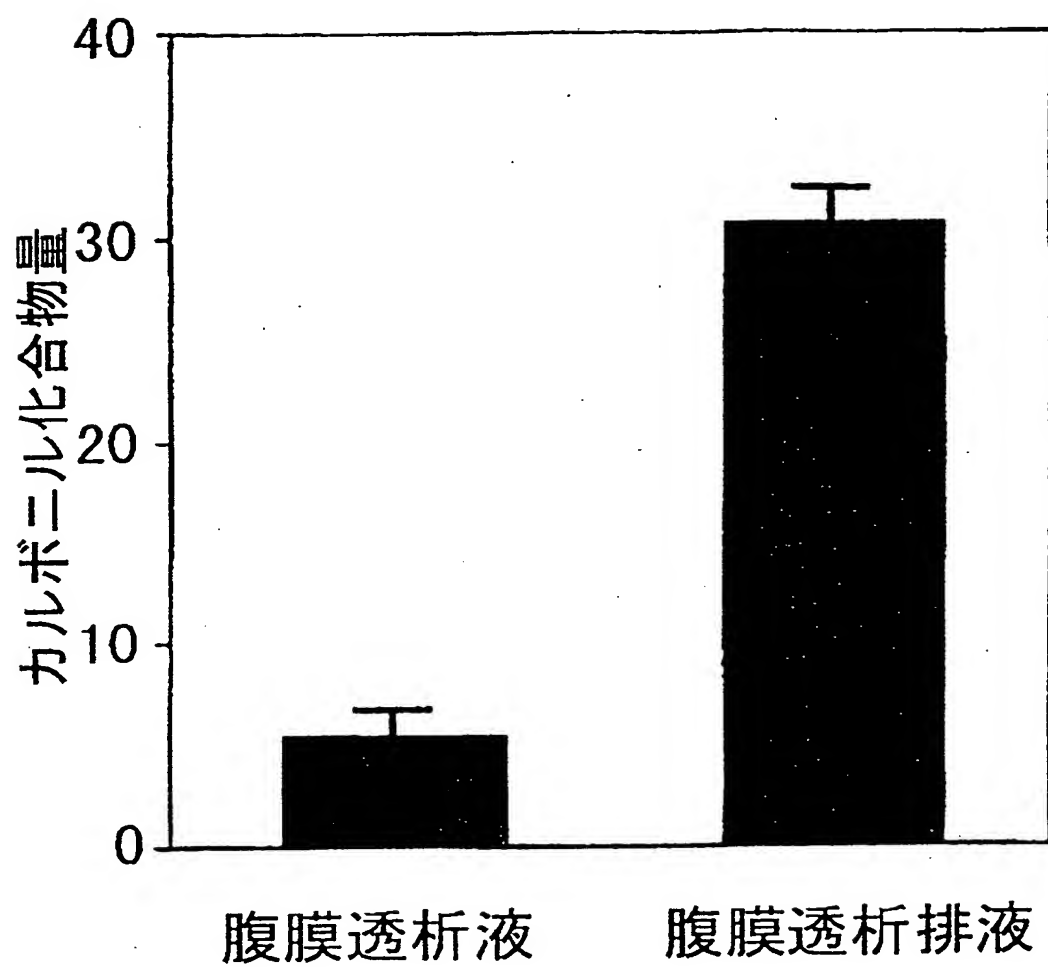


b) カルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液を分離する工程

10. カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液。
11. 第1室および第2室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第1室に還元糖が収容され、第2室にカルボニル化合物トラップ剤が収容されているものである、請求項10に記載の腹膜透析液。
12. カルボニル化合物トラップ剤が腹膜透析液とともに腹腔内に投与するためのものである、請求項10に記載の腹膜透析液。

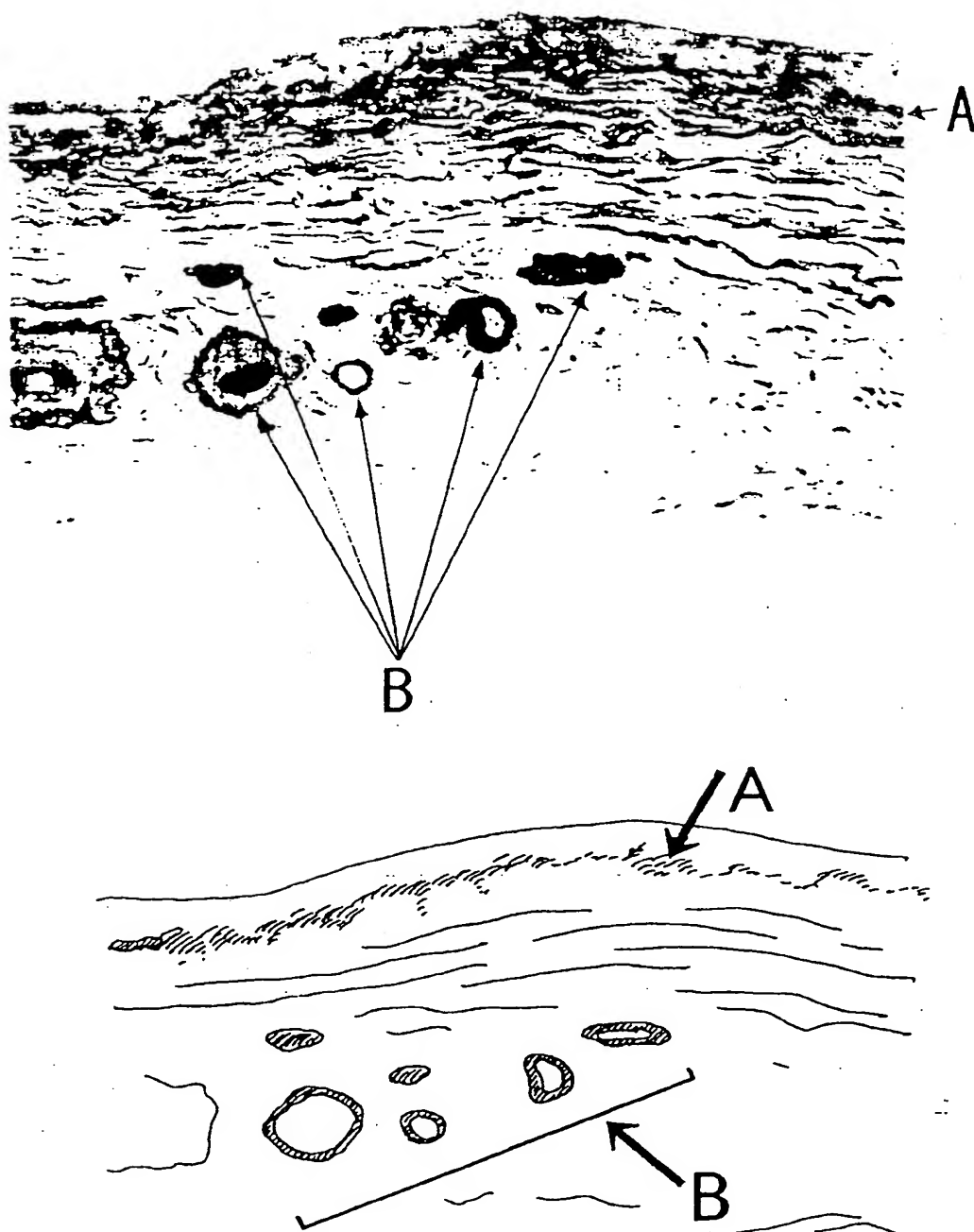
1 / 27

図 1



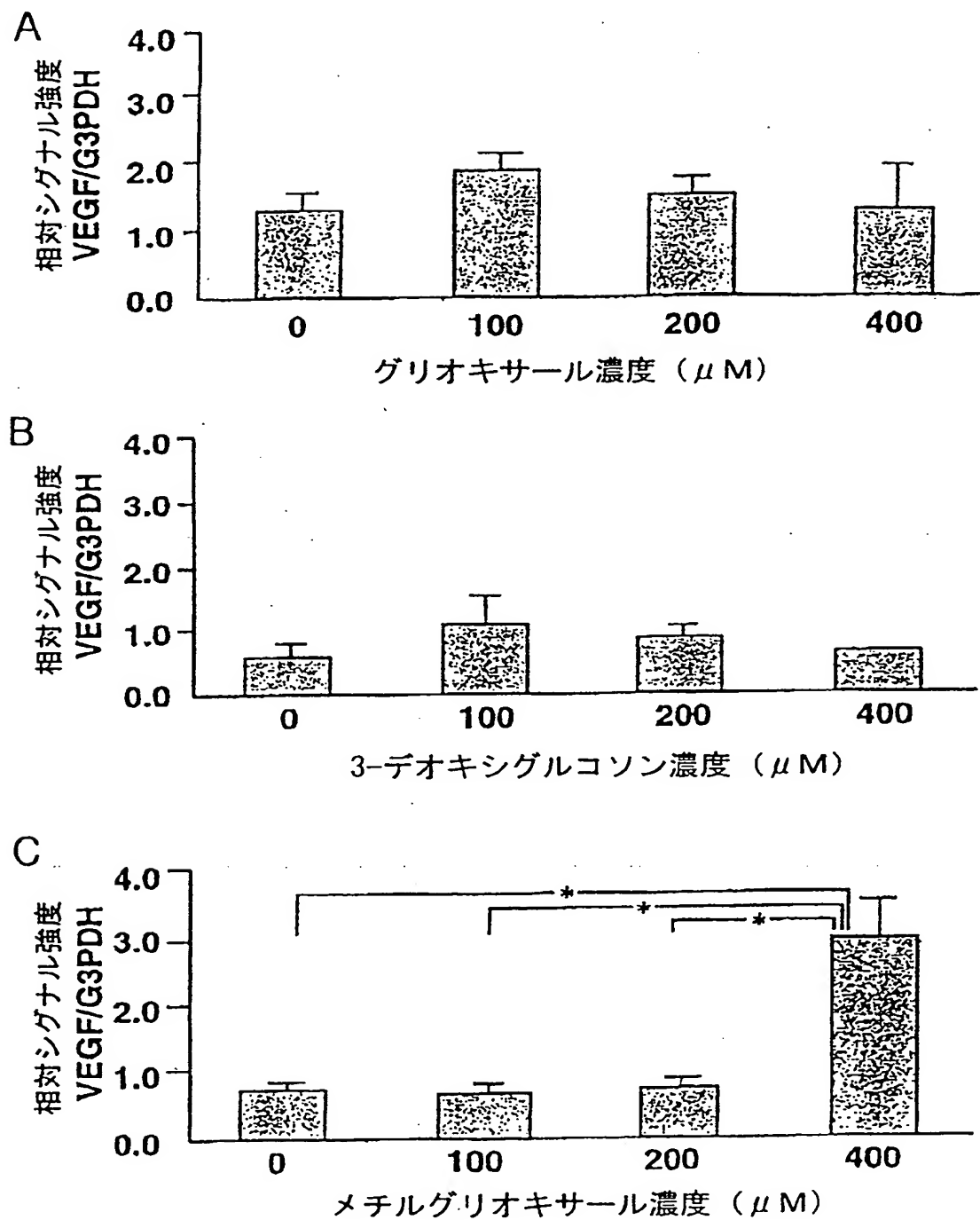
2 / 27

図 2



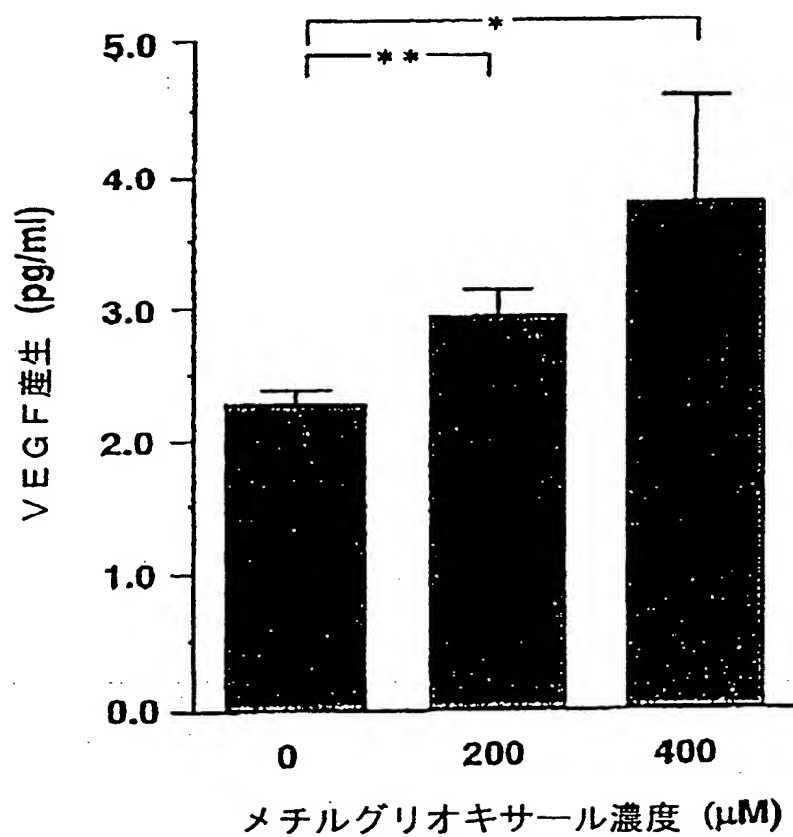
3 / 27

図 3



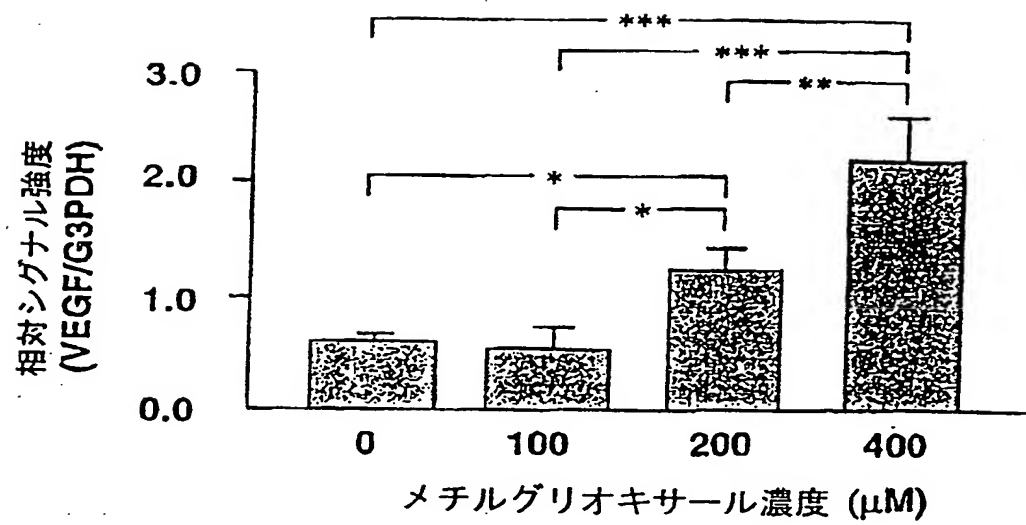
4 / 27

図4



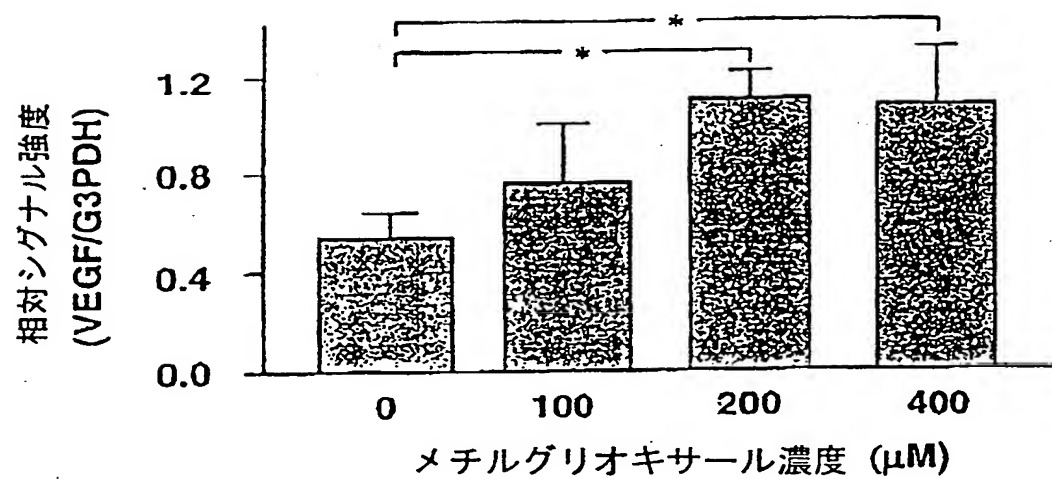
5 / 27

図 5



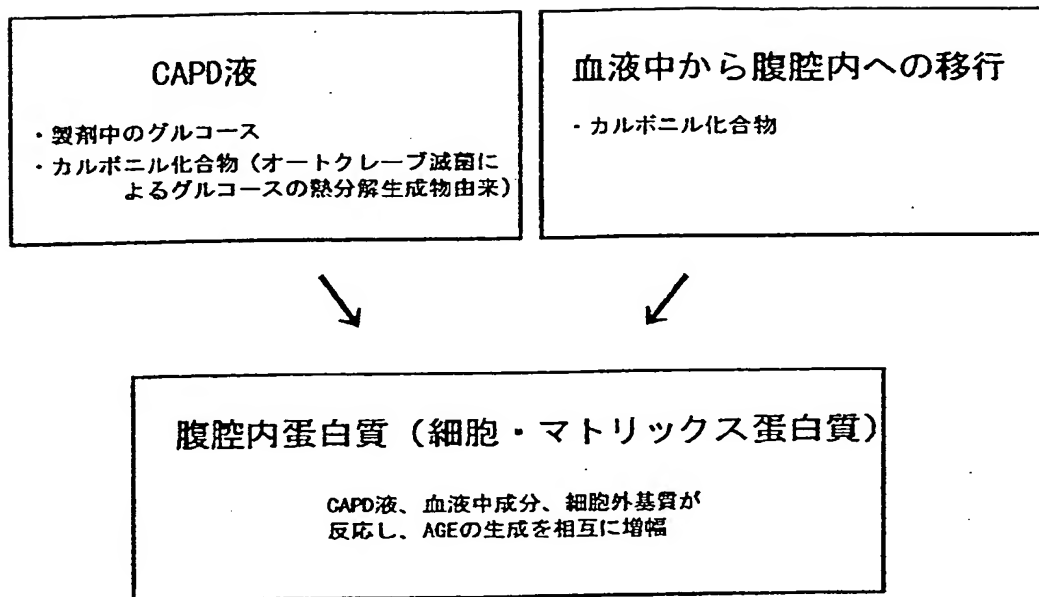
6 / 27

図 6



7 / 27

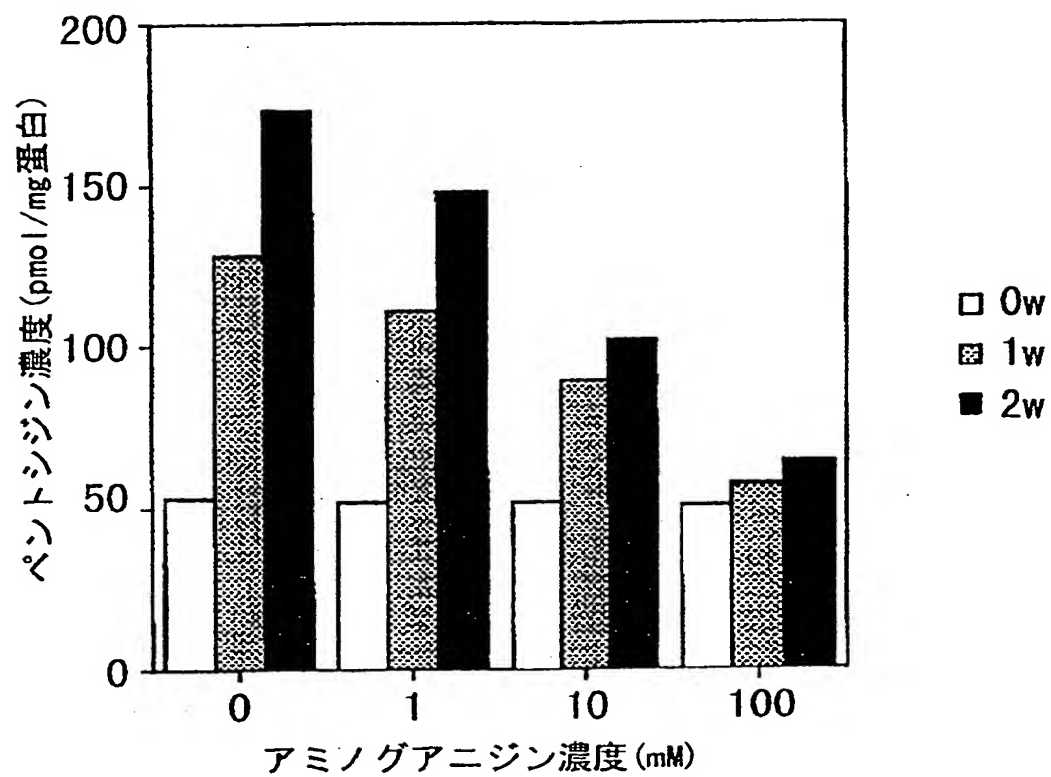
図 7





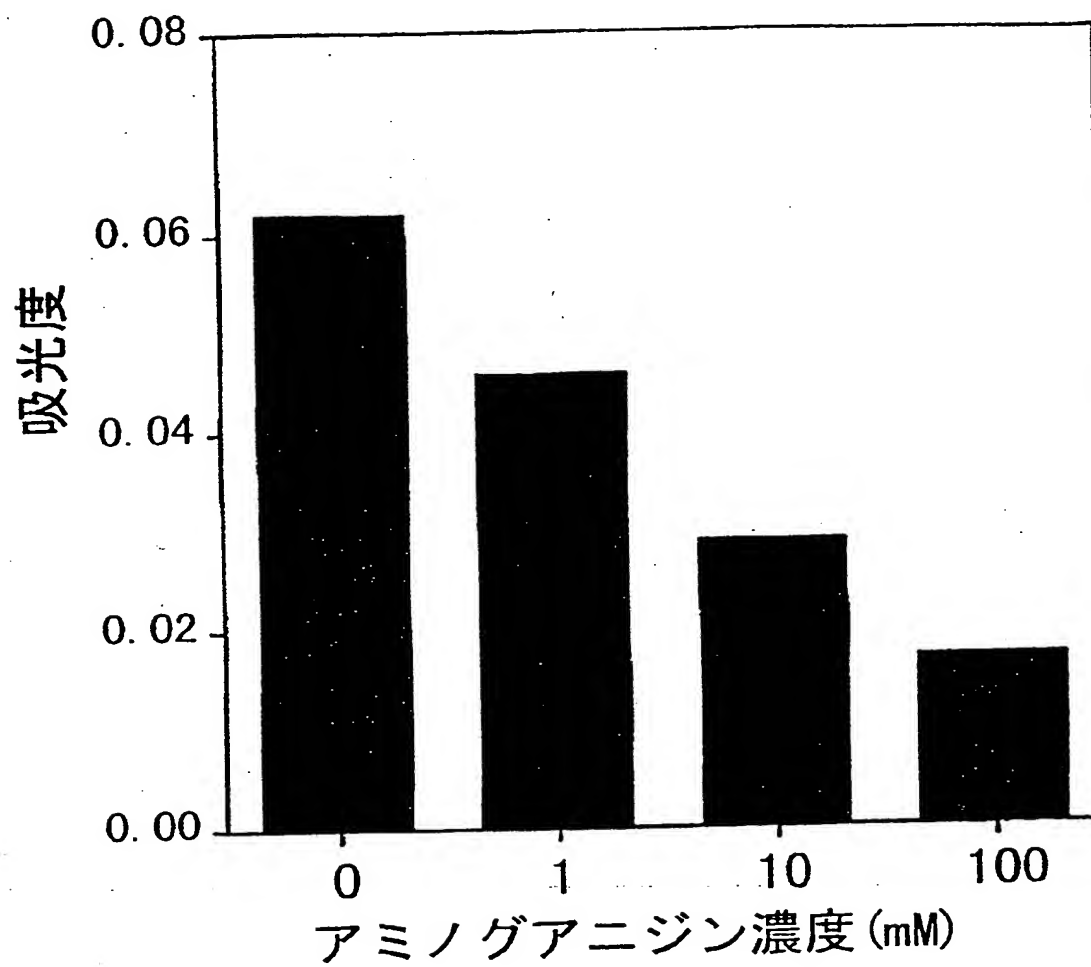
8 / 27

図 8



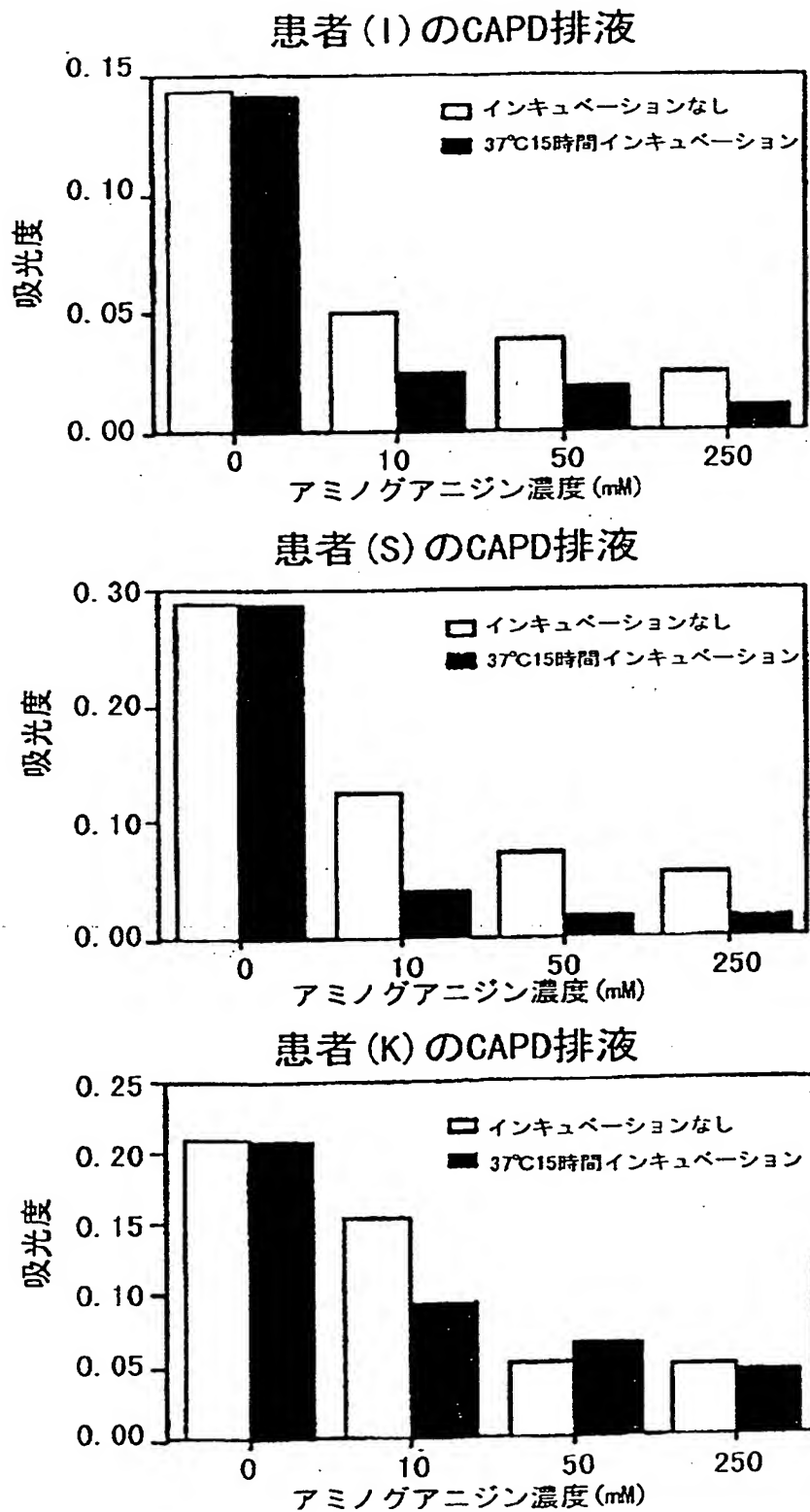
9 / 27

図 9



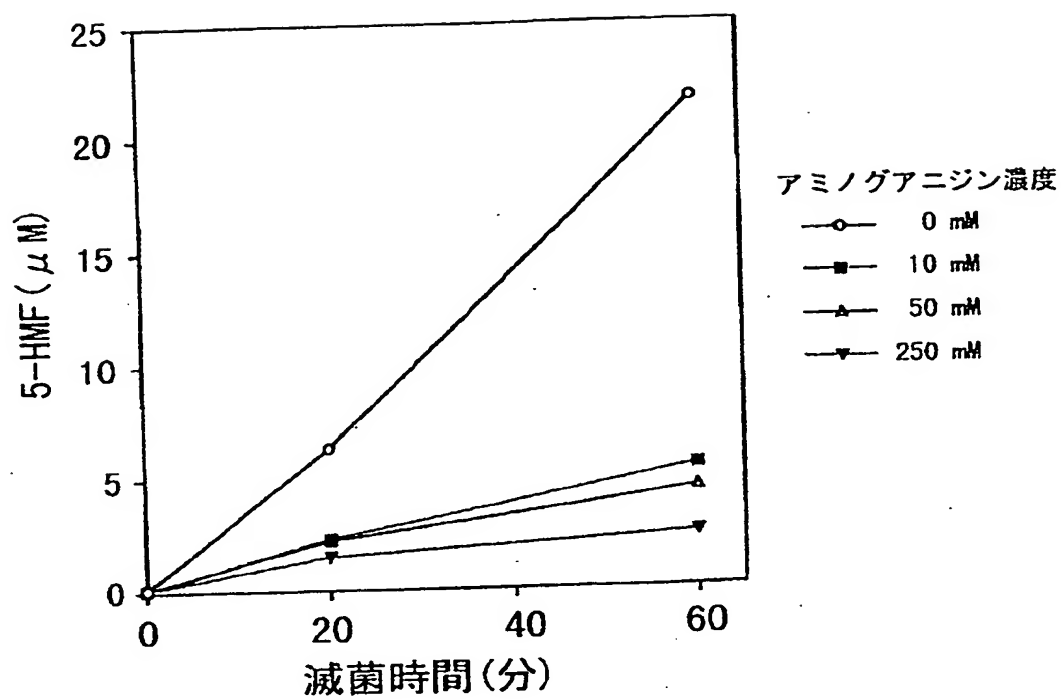
10/27

図10



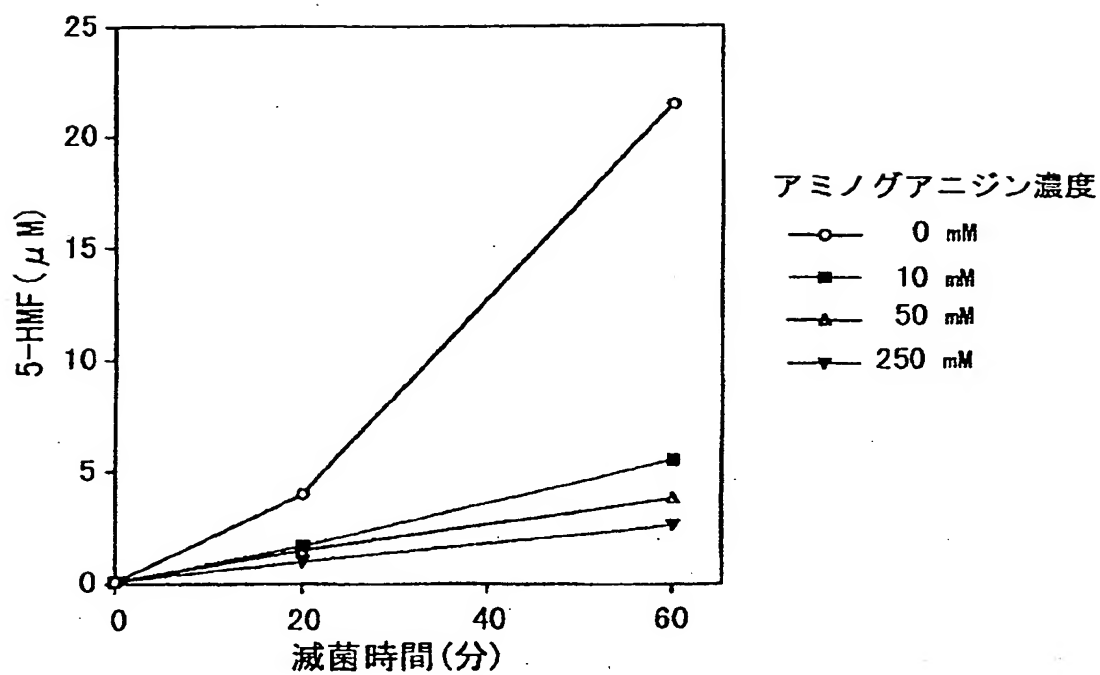
11/27

図 11



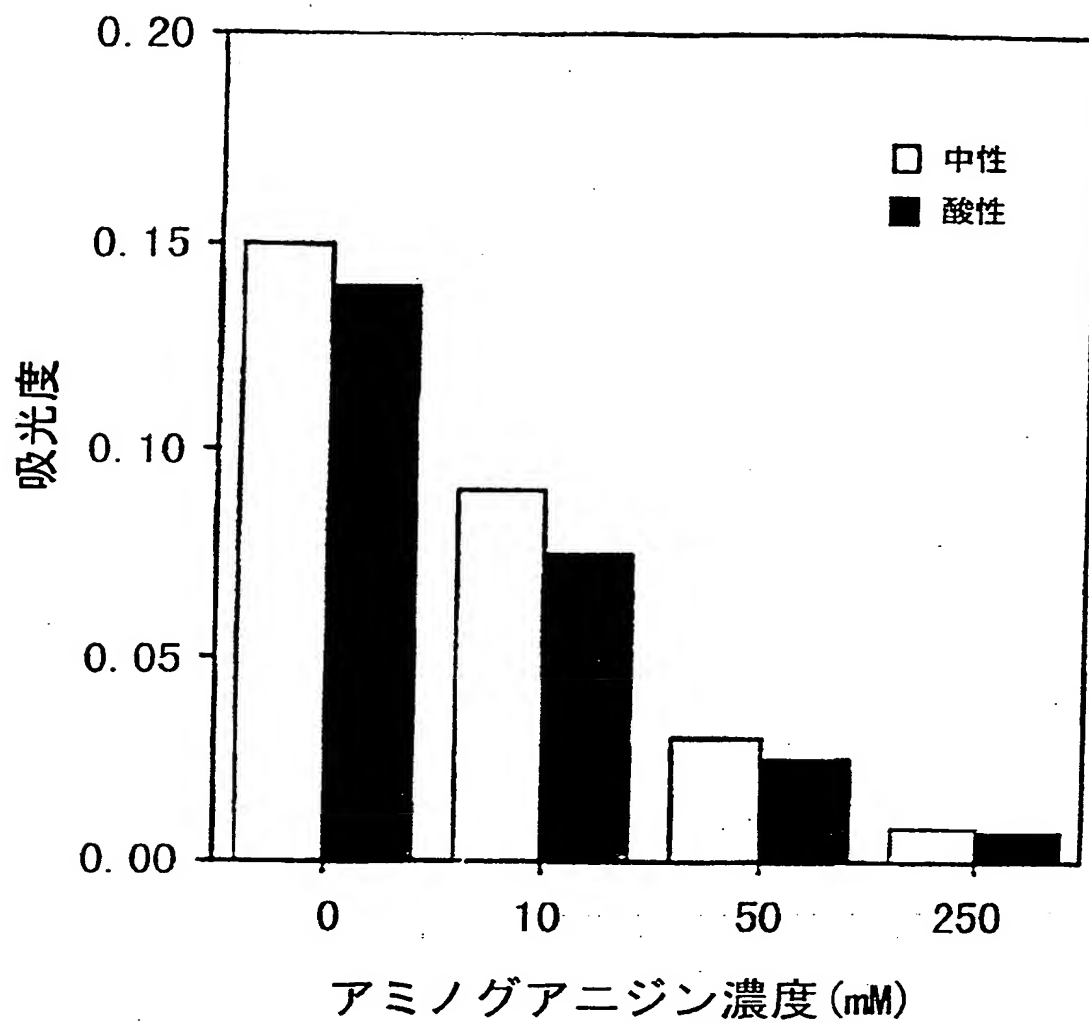
12/27

図 12



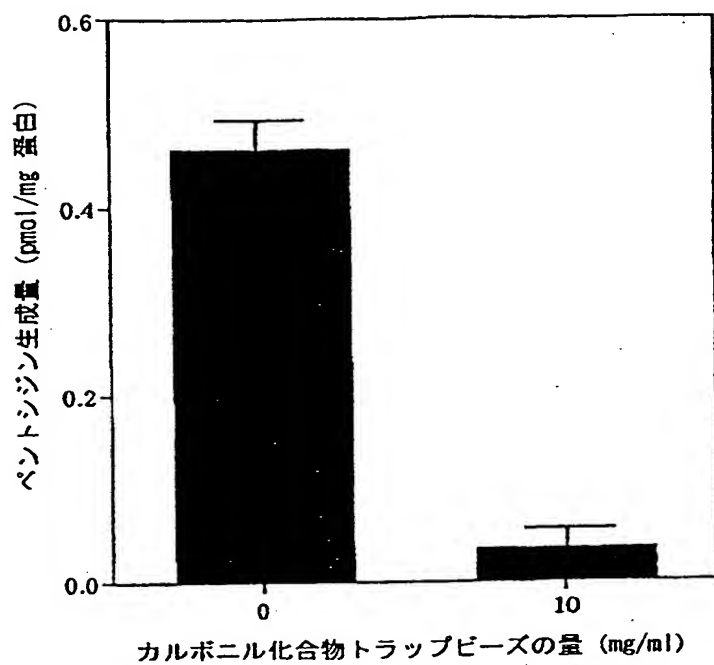
13/27

図13



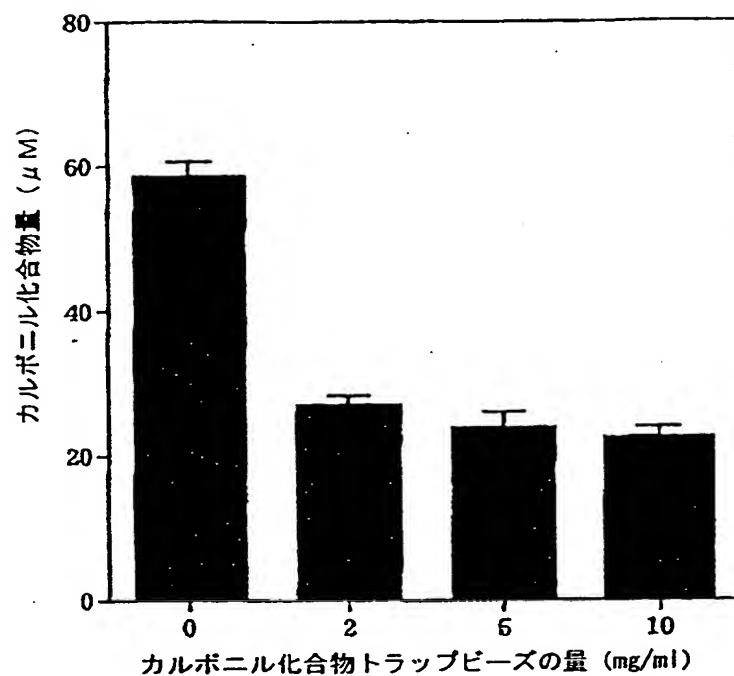
14/27

図 14



15 / 27

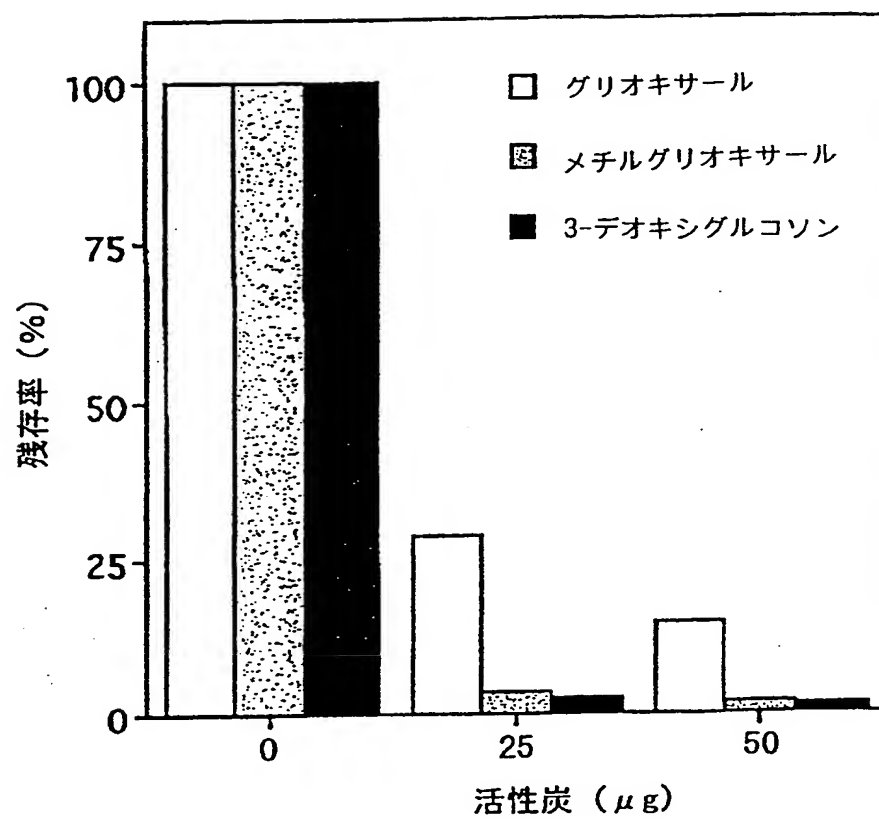
図 15





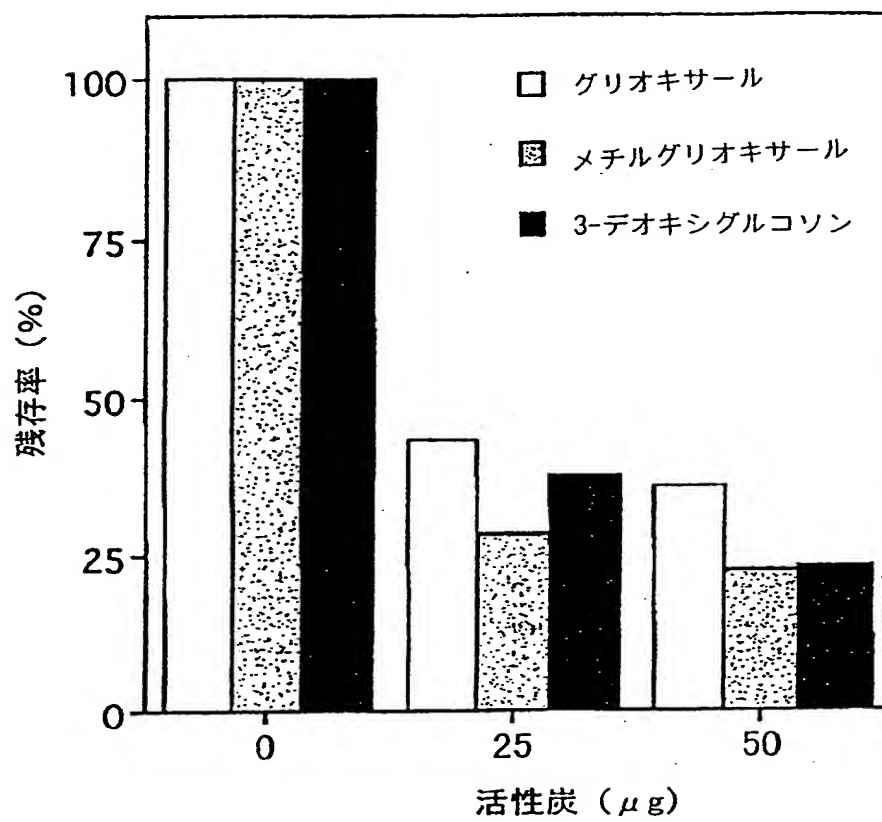
16/27

図 16



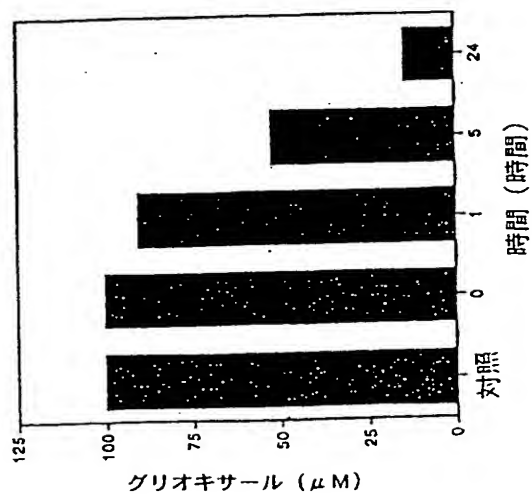
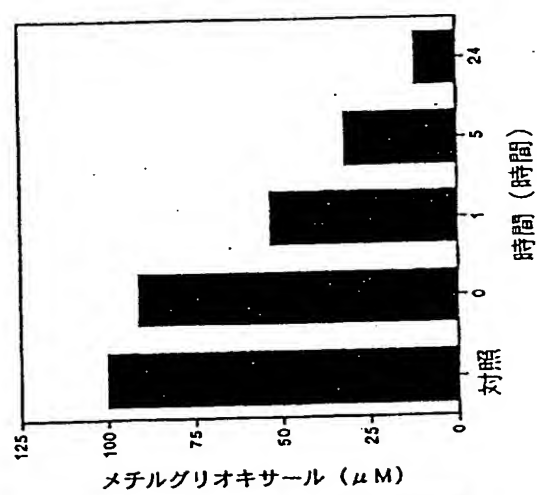
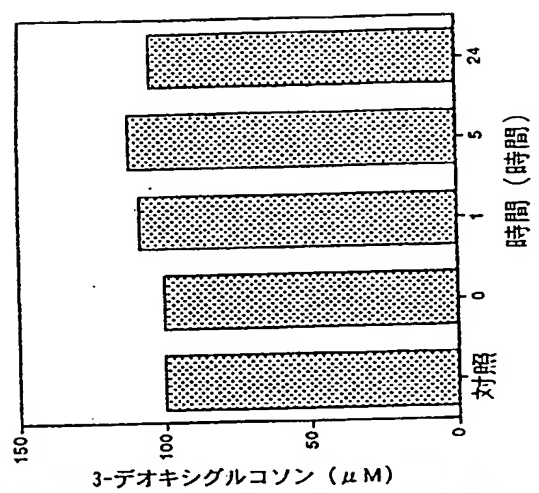
17/27

図 17



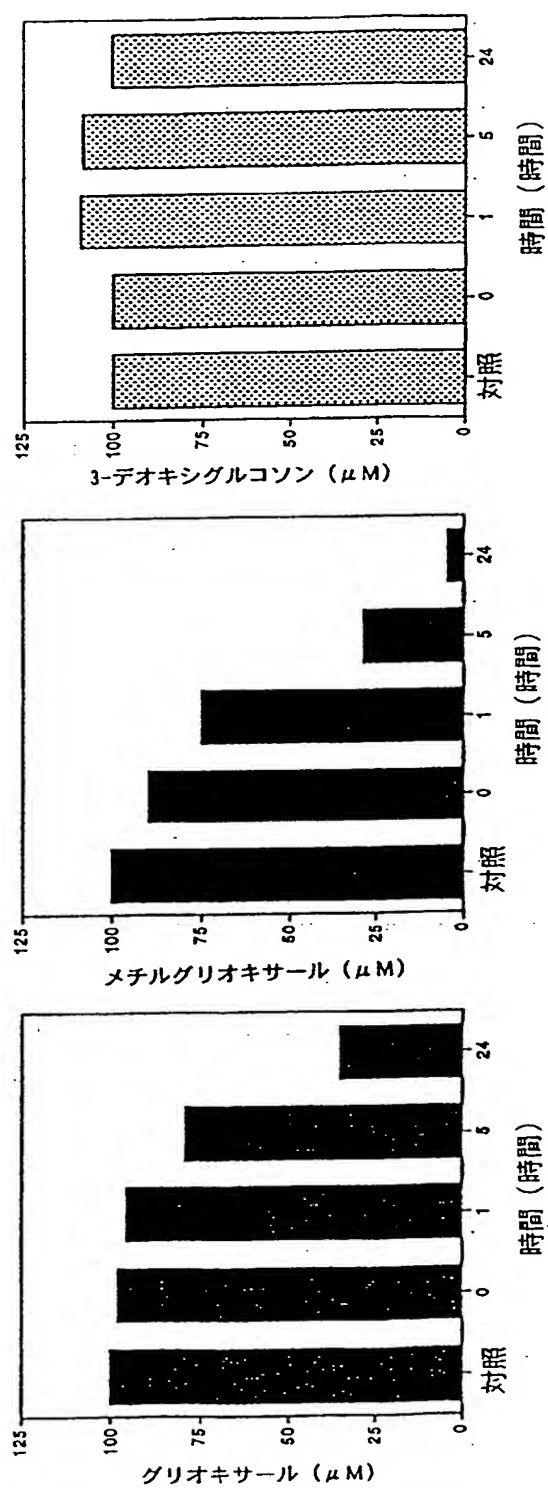
18/27

図 18



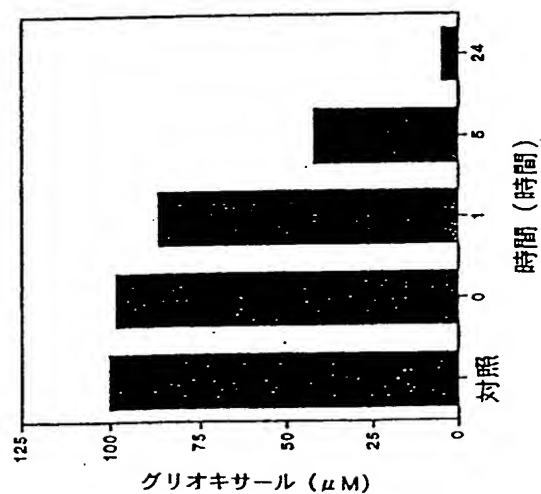
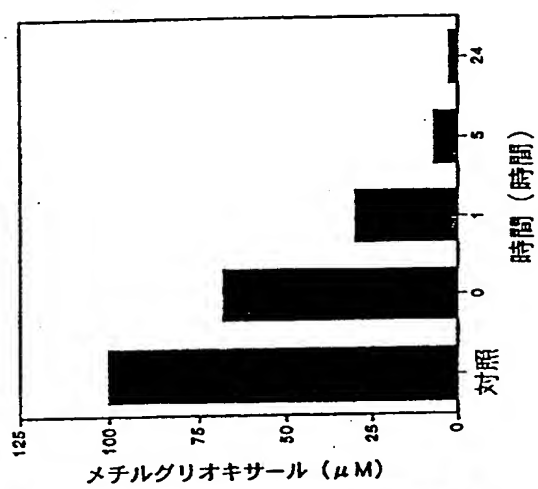
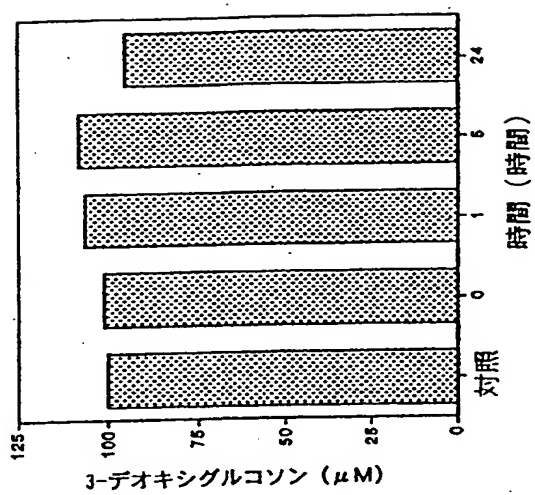
19/27

図 19



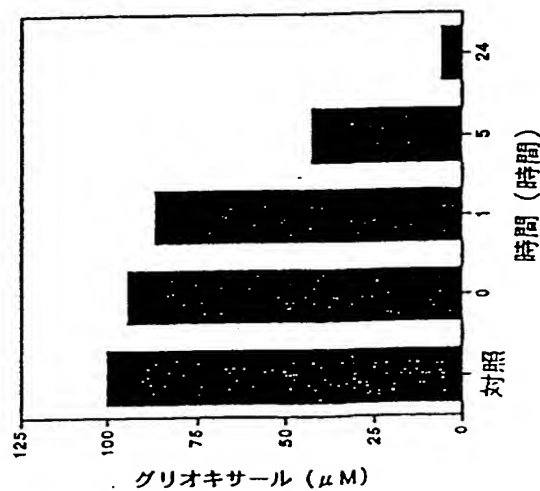
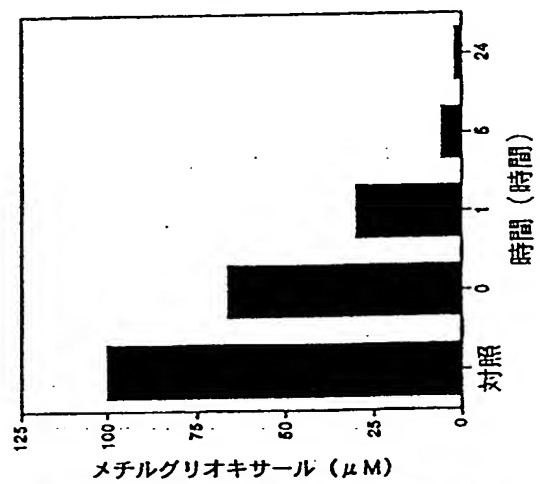
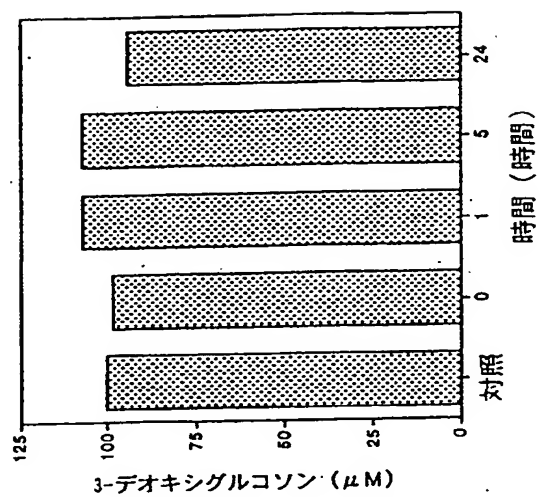
20/27

図 20



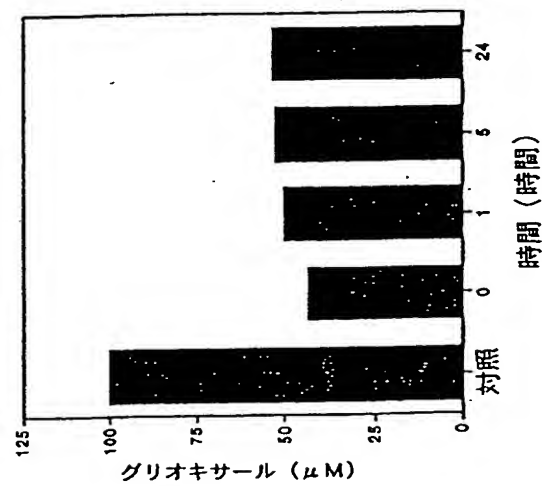
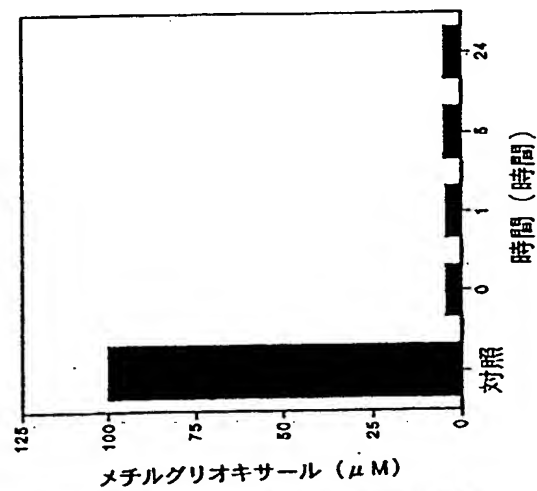
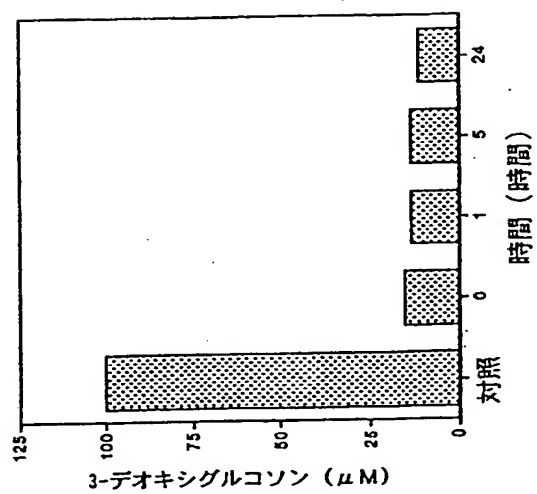
21/27

図 21



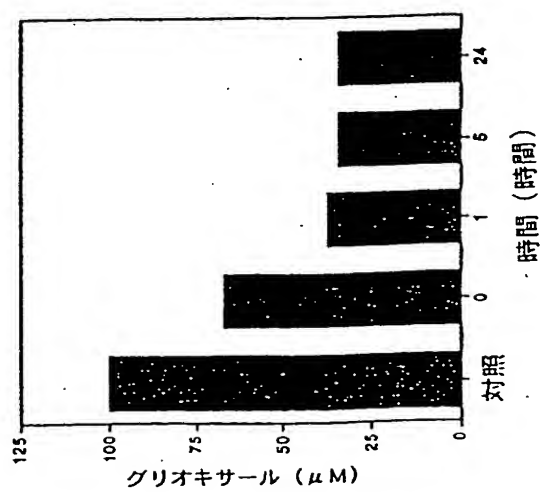
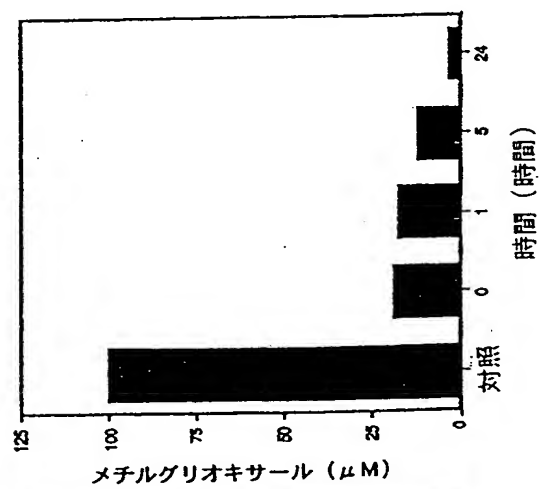
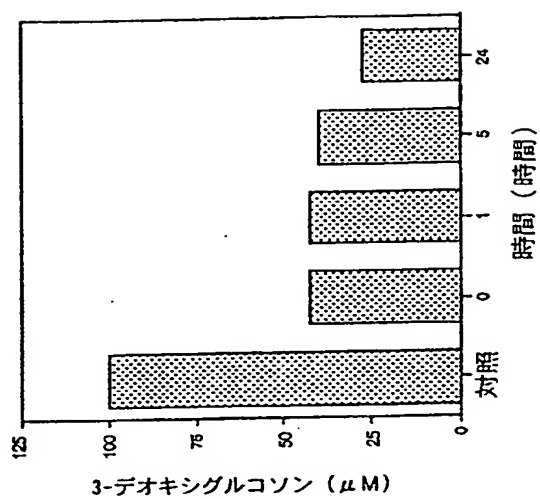
22/27

図 22



23/27

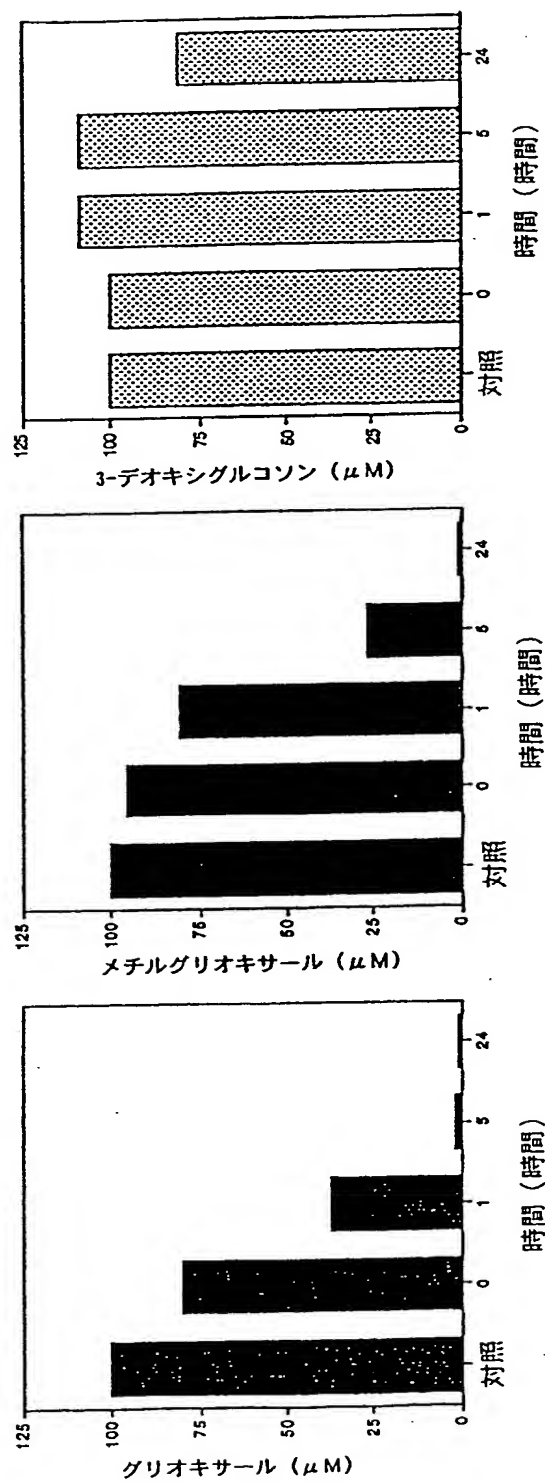
図 23





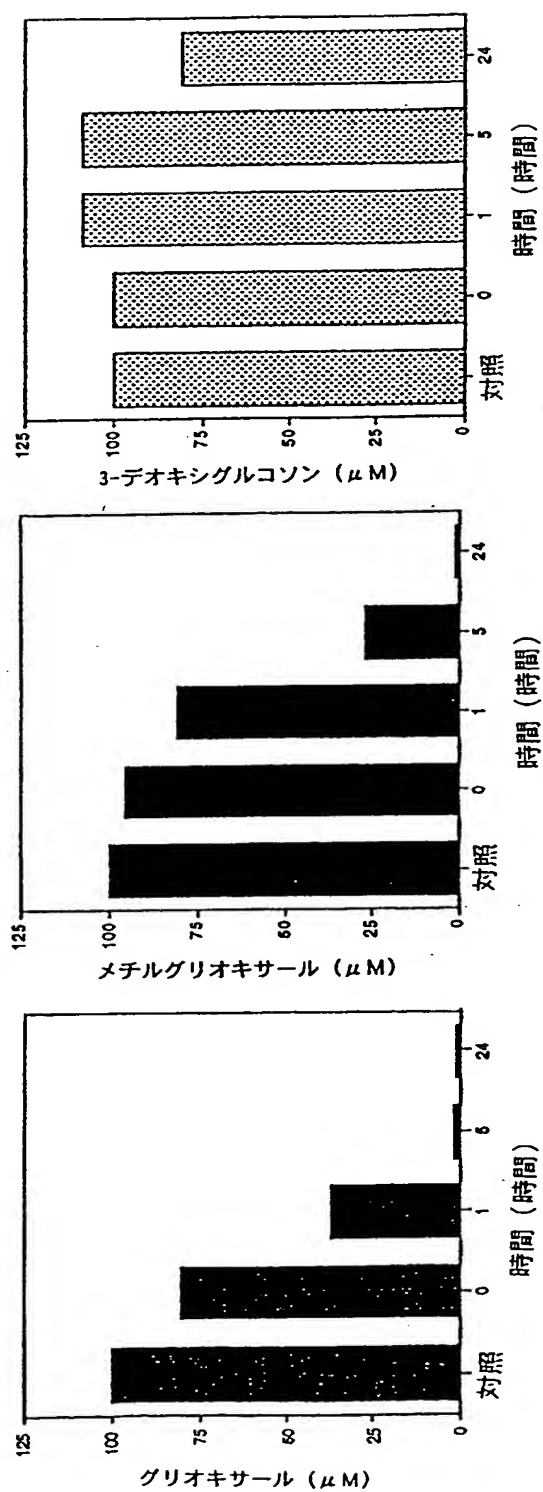
24/27

図 24



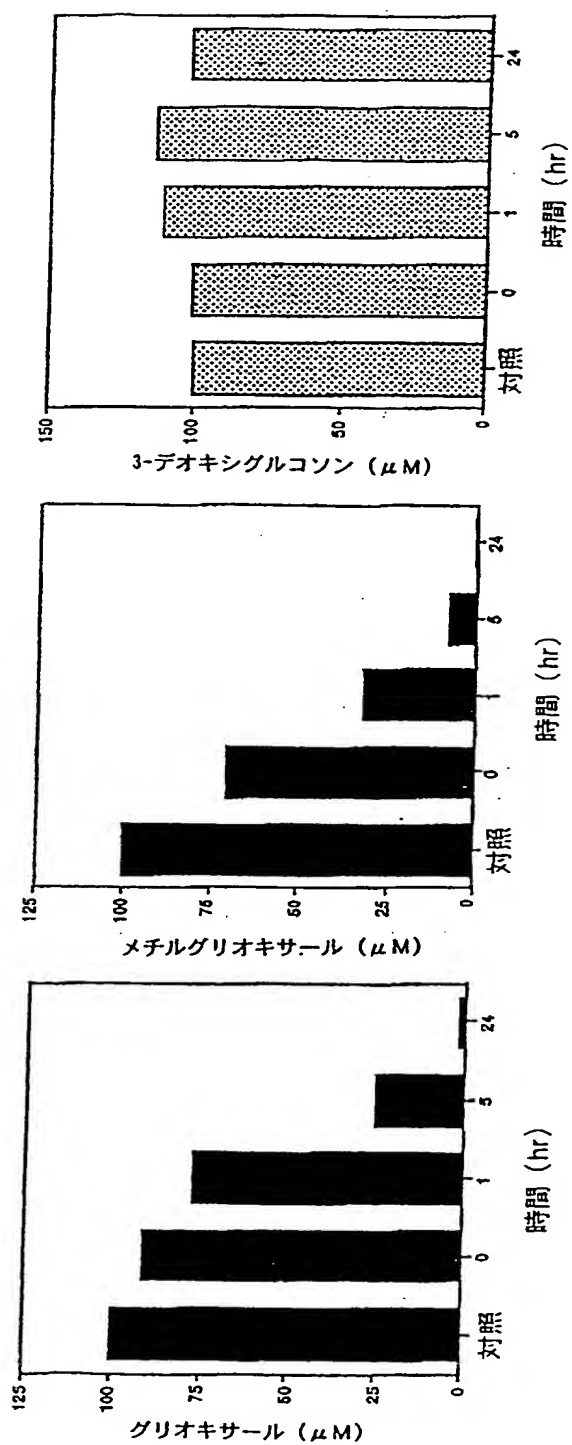
25/27

図 25



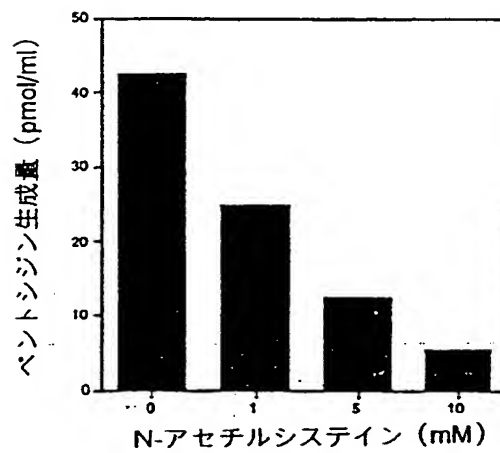
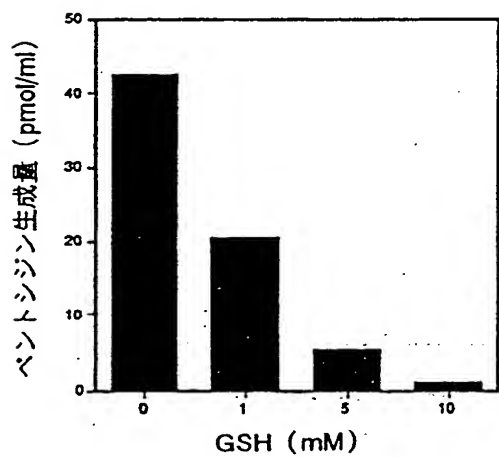
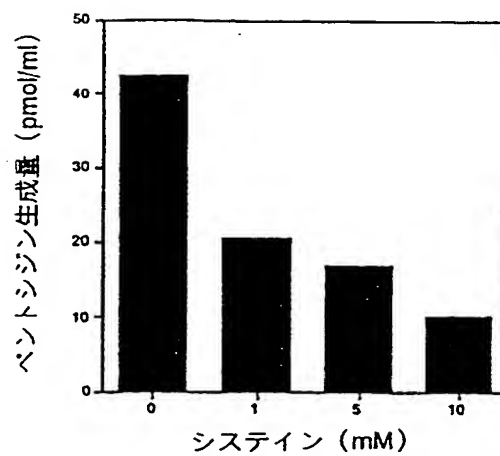
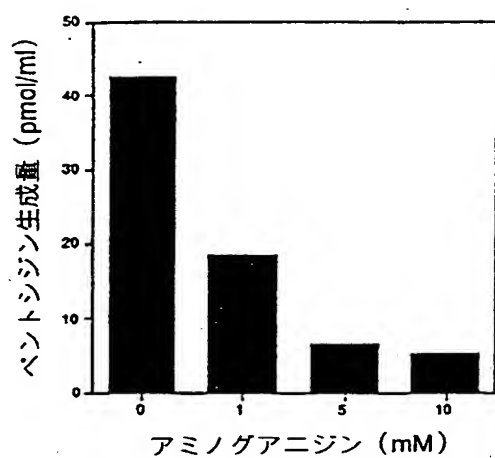
26/27

図 26



27 / 27

図 27



1/3

配列表  
SEQUENCE LISTING

<110> KUROKAWA Kiyoshi

黒川 清

MIYATA Toshio

宮田 敏男

<120> Agent for Ameliorating Condition of Carbonyl Stress,  
and Peritoneal Dialysis Fluid.

カルボニルストレス状態改善剤、および腹膜透析液

<130> KRK002DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-237108

<151> 1998-08-24

<150> JP 1999-155393

<151> 1999-06-02

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

2/3

actggaccct ggctttactg c

21

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 2

ttggtgaggt ttgatccgca tg

22

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 3

cctgcaccac caactgctta gccc

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

gatgtcatca tatttggcag gtt

23

3/3

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

ggcagaatca tcacgaagtg gtg

23

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

ctgtaggaag ctcattcttc c

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04521

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, 31/155, 31/15, 33/44, 31/44, 31/195, 38/38, A61M1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, 31/155, 31/15, 33/44, 31/44, 31/195, 38/38, A61M1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), WPIL (QUESTEL)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NIWA, Toshimitsu et al., Modification of $\beta_2m$ with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulating in uremic serum, Kidney International, 1996, Vol. 49, No. 3, pp.861-867, Abstract, Page 863, right column, line 50 to page 864, left column, line 4	1-5 6
X	JP, 5-105633, A (Shimizu Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 April, 1993 (27. 04. 93) (Family: none) Reference as a whole	4, 10, 12
Y	TANAKA, Yasushi et al., INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS, CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, 1997, Vol. 58, No. 10, pp.693-697, Reference as a whole	5
Y	LO, Theodore W.C. et al., Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions, The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 51, pp.32299-32305, Reference as a whole	5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
26 October, 1999 (26. 10. 99)Date of mailing of the international search report  
9 November, 1999 (09. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/04521

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NIQUETTE, Patrick et al., Backwashing first-stage sand-BAC filters, J.-Am. Water Works Assoc., Jan. 1998, Vol. 90, No. 1, pp.86-97, Abstract, Page 91, right column, line 16 to page 92, right column, line 6	6
A	JP, 4-187158, A (Nissho Corp.), 3 July, 1992 (03. 07. 92) (Family: none)	7-12
A	JP, 8-131542, A (Baxter K.K.), 28 May, 1996 (28. 05. 96) (Family: none)	7-12
A	JP, 6-507822, A (Baxter Deutschland GmbH.), 8 September, 1994 (08. 09. 94) & EP, 564672, A1 & WO, 93/19792, A1 & US, 5827820, A	7-12
P, X	US, 5891341, A (Yong Ming Li), 6 April, 1999 (06. 04. 99), Column 2, line 56 to column 3, line 3 ; column 12, line 43 to column 13, line 15 & US, 5855882, A & US, 5861238, A & US, 5962245, A	1-12





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K45/00, 31/155, 31/15, 33/44, 31/44, 31/195,  
38/38, A61M1/28

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> A61K45/00, 31/155, 31/15, 33/44, 31/44, 31/195,  
38/38, A61M1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), WPIL (QUESTEL)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X ① Y	NIWA, Toshimitsu et al, Modification of $\beta_{2m}$ with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulating in uremic serum, Kidney International, 1996, Vol.49, No.3, pp.861-867, Abstract, 第863ページ 右欄第50行—第864ページ 左欄第4行	1-5 6
X ②	J P, 5-105633, A (清水製薬株式会社) 27. 4月. 1993 (27. 04. 93) ファミリーなし 文献全体 (CAP?)	4, 10, 12

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浅田 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y ③	TANAKA, Yasushi et al, INHIBITORY EFFECT OF METFORMIN ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS, CURRENT THERAPEUTIC RESEARCH, 1997, Vol. 58, No. 10, pp. 693-697, 文献全体	5
Y ④	LO, Theodore W.C. et al, Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiologocal Conditions, The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 51, pp. 32299-32305, 文献全体	5
Y ⑤	NIQUETTE, Patrick et al, Backwashing first-stage sand-BAC filters, J.-Am. Water Works Assoc., Jan. 1998, Vol. 90, No. 1, pp. 86-97, Abstract, 第91ページ右欄16行-第92ページ右欄第6行	6
CAPI Device A ⑥	J P, 4-187158, A (株式会社ニッショー) 03. 7月. 1992 (03. 07. 92) ファミリーなし	7-12
CAPI A ⑦	J P, 8-131542, A (バクスター株式会社) 28. 5月. 1996 (28. 05. 96) ファミリーなし	7-12
CAPI A ⑧	J P, 6-507822, A (バクスター・ドイチェラント・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクダー・ハフツング) 08. 9月. 1994 (08. 09. 94) & EP, 564672, A1 & WO, 93/19792, A1 & US, 5827820, A	7-12
P, X ⑨	US, 5891341, A (Yong Ming Li) 06. 4月. 1999 (06. 04. 99) 第2欄第56行-第3欄第3行、第12欄第43行-第13欄第15行 & US, 5855882, A & US, 5861238, A & US, 5962245, A	1-12

## DESCRIPTION

## CARBONYL-STRESS IMPROVING AGENT AND PERITONEAL DIALYSATE

5 Technical Field

The present invention relates to a peritoneal dialysate used for treating patients with renal failure.

Background Art

10 Two types of dialysis, hemodialysis and peritoneal dialysis, are used to treat patients with chronic renal failure. Peritoneal dialysis is a method in which the dialysate is allowed to dwell in the peritoneal cavity for a certain period of time, thereby facilitating the excretion of waste products out of the body into the dialysate through the  
15 peritoneum. The dialysate is then recovered. Peritoneal dialysis is subdivided into intermittent peritoneal dialysis (IPD) and continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). CAPD is a method that incorporates the merits of the IPD method in which the fluid exchange is carried out about four times a day by lengthening the  
20 dwelling time of the perfusate in the peritoneal cavity.

Peritoneal dialysis has advantages such as being convenient and less time-consuming. However, it is known that long-term treatment with peritoneal dialysis can progressively lower the ability of water removal, and can result in abdominal protein denaturation and  
25 hardening, peritoneal fusion, and such abnormalities.

A part of the cause is thought to be glucose present in the peritoneal dialysate. Many types of peritoneal dialysates used today contain glucose as an osmoregulatory agent. Glucose is unstable to heat, and a part thereof is degraded during heat sterilization. As  
30 a result, highly reactive carbonyl compounds capable of modifying proteins may generate as degradation products. Such degradation products may also generate and accumulate in a glucose-containing peritoneal dialysate even during storage that follows sterilization.

Generally, glucose is apt to degrade at a nearly neutral or alkaline  
35 pH, and therefore, acidic buffers (pH 5.0-5.4) are selected to maintain the stability of glucose in ordinary peritoneal dialysates. However,

such acidic buffers carry risks such as suppressing immunological defense mechanisms of peritoneal macrophages, causing the onset of peritonitis due to bacterial infection, and being cytotoxic to peritoneal mesothelial cells. To overcome such mutually  
5 contradictory problems, there was a desperate need to prevent generation of carbonyl compounds resulting from the degradation of glucose within peritoneal dialysates around a neutral pH, or eliminate such compounds.

On the other hand, a peritoneal dialysate formulated with a high  
10 concentration of glucose can modify proteins, and therefore, such dialysates are unfavorable for the peritoneum. From such a viewpoint, some peritoneal dialysates have been developed by utilizing glucose polymers that generate few degradation products (Unexamined Published Japanese Patent Application (JP-A) NO. Hei 10-94598; Wilkie, M.E.  
15 et al., Perit. Dial. Int., 17: S47-50 (1997)).

From the same viewpoint, other compounds have been proposed in place of glucose as osmoregulatory agents used in peritoneal dialysates. These include, cyclodextrin (JP-A Hei 8-71146), disaccharide (JP-A Hei 8-131541), and amino acids (Faller, B. et al.,  
20 Kidney Int., 50 (suppl.56), S81-85 (1996)). A peritoneal dialysate having cysteine as an additive to prevent the degradation of glucose has also been disclosed (JP-A Hei 5-105633).

These methods aim to improve inconveniences caused by the high concentration of glucose within the peritoneal dialysate.

25 It has been reported that, irrespective of the presence or absence of hyperglycemia, large amounts of highly reactive carbonyl compounds and AGE (advanced glycation end products) are accumulated in the blood and tissues of patients with chronic renal failure (Miyata, T. et al., Kidney Int., 51:1170-1181 (1997); Miyata, T. et al., J. Am. Soc.  
30 Nephrol., 7: 1198-1206 (1996); Miyata, T. et al., Kidney Int. 54:1290-1295 (1998); Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 9:2349-2356 (1998)). Renal failure often accompanies conditions having an overload of carbonyl compounds (carbonyl stress). This carbonyl stress results from non-enzymatic biochemical reactions to generate  
35 carbonyl compounds from sugars and lipids, which is thought to lead to enhanced protein modifications (Miyata, T. et al., Kidney Int.

55:389-399 (1999)). Carbonyl stress not only alters the architecture of matrix proteins such as collagen and fibronectin, but also participates in the enhancement of peritoneal permeability and the onset of inflammation due to the physiological activities of carbonyl compounds towards a variety of cells.

In peritoneal dialysis, waste products in the blood are excreted into the peritoneal dialysate through the peritoneum. A hyperosmotic peritoneal dialysate dwelling within the peritoneal cavity collects highly reactive carbonyl compounds accumulated in the blood of renal failure patients through the peritoneum into itself. Thus, the carbonyl-compound concentration in the peritoneal dialysate elevates, resulting in a carbonyl-stress state. This is thought to cause carbonyl modification of proteins in the peritoneal cavity and as a consequence, the peritoneal functions are suppressed to advance peritoneal sclerosis.

Immunohistochemical examination of the endothelium and mesothelium, has demonstrated that the carbonyl-stress state is caused by glucose present in the peritoneal cavity in peritoneal-dialysis patients (Yamada, K. et al., Clin. Nephrol., 42: 354-361 (1994); Nakayama, M. et al., Kidney Int., 51: 182-186 (1997); Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press; Combet, S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press; Inagi, R. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press).

#### Disclosure of the invention

An objective of the present invention is to provide a method for reducing damage from carbonyl compounds during peritoneal dialysis, specifically for improving the carbonyl-stress state, as well as to provide a dialysate and pharmaceutical agent required for this method. The "carbonyl compound" in the present invention means a carbonyl compound derived from patients undergoing peritoneal-dialysis, a carbonyl compound generated in the peritoneal dialysate during manufacturing or storing, and a carbonyl compound generated in the peritoneal cavity during peritoneal dialysis. The present invention aims to minimize as much as possible the damages from these carbonyl compounds on the patients undergoing dialysis.

The present inventors have discovered that the highly reactive



carbonyl compounds present in the peritoneal dialysate in peritoneal dialysis patients are not merely those present in the original peritoneal dialysate that have been infused into the peritoneal cavity. Specifically, the amount of glucose-excluded carbonyl compounds in the peritoneal dialysate recovered from peritoneal-dialysis patients is five times more than the amount before dialysis, and thus, the majority of the carbonyl compounds is assumed to derive from blood (Fig. 1). Therefore, it has been revealed that the carbonyl compounds present in the peritoneal dialysate in the peritoneal cavity, include not only carbonyl compounds generated in the process of heat sterilization and those that accumulate during storage, but also those that are derived from blood and those that generate and accumulate within the peritoneal cavity during dialysis, the latter two being not negligible. Immunohistochemical examinations of peritoneal tissue from peritoneal-dialysis patients have revealed the presence of carbonyl-modified proteins (Fig. 2). Accordingly, if it is possible to remove carbonyl compounds transferred from the blood into the peritoneal cavity during peritoneal dialysis, the carbonyl-stress state would also be effectively improved.

The present inventors thought that renal failure should often accompany conditions in which *in vivo* protein modification was enhanced and that, when glucose was continuously infused at a high concentration into the peritoneal cavity by a method such as peritoneal dialysis, intraperitoneal proteins would be increasingly susceptible to non-enzymatic modifications due to the peritoneal dialysate in which peritoneal cavity-derived carbonyl compounds were accumulated (Fig. 7).

Based on such a background, the present inventors have discovered that a carbonyl compound-trapping agent is effective in preparing a dialysate capable of reducing carbonyl compounds of peritoneal dialysate origin, and thus, completed the present invention. Focusing mainly on carbonyl compounds that accumulate within blood, the present inventors have further found that pharmaceutical agents that prevent protein modifications caused by carbonyl stress and such peritoneal dialysis-associated complications, are useful, thereby further completing the present invention.

Specifically, the present invention relates to a carbonyl-stress improving agent, and a peritoneal dialysate based thereon, as well as a pharmaceutical agent. The present invention relates more specifically to:

5 (1) an agent for improving intraperitoneal carbonyl-stress state during peritoneal dialysis, comprising a carbonyl compound-trapping agent as an active ingredient;

(2) the agent of (1), wherein the carbonyl compound-trapping agent is immobilized on an insoluble carrier;

10 (3) the agent of (1), wherein the carbonyl compound-trapping agent is to be mixed with a peritoneal dialysate;

(4) the agent of any one of (1) to (3), wherein the carbonyl compound-trapping agent is selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, SH group containing  
15 compound, and derivatives of these;

(5) the agent of any one of (1) to (3), wherein the carbonyl compound-trapping agent is an agent inhibiting Maillard reaction;

(6) the agent of (1), wherein the carbonyl compound-trapping agent is a compound insoluble in peritoneal dialysates and capable of  
20 adsorbing carbonyl compounds;

(7) a cartridge used for trapping carbonyl compounds within peritoneal dialysates, wherein the cartridge is filled with the carbonyl compound-trapping agent(s) of (2) and/or (6);

(8) a method for preparing a peritoneal dialysate having a reduced  
25 carbonyl compound content, the method comprising passing the peritoneal dialysate through the cartridge of (7);

(9) a method for preparing a peritoneal dialysate having a reduced carbonyl compound content, the method comprising:

(a) contacting the peritoneal dialysate with the carbonyl  
30 compound-trapping agent(s) of (2) and/or (6) and  
(b) separating the peritoneal dialysate from the carbonyl compound-trapping agent;

(10) a peritoneal dialysate comprising a carbonyl compound-trapping agent;

35 (11) the peritoneal dialysate of (10), wherein the peritoneal dialysate further comprises a reducing sugar, and is placed in a

container comprising a first compartment and a second compartment so that the first compartment contains the reducing sugar and the second compartment contains the carbonyl compound-trapping agent; and

- 5       (12) the peritoneal dialysate of (10), wherein the carbonyl compound-trapping agent is to be administered into the intraperitoneal cavity.

10       The present invention further relates to the use of carbonyl compound-trapping agent for improving intraperitoneal carbonyl-stress state. The present invention also relates to the use of carbonyl compound-trapping agent for the peritoneal dialysis treatment. Furthermore, the present invention relates to the use of carbonyl compound-trapping agent for producing an agent improving carbonyl stress.

15       In the present invention, the carbonyl compounds to be trapped include, for example, carbonyl compounds generated in the processes of production and storage of a peritoneal dialysate. As described above, carbonyl compounds can always be generated in a peritoneal dialysate containing a high concentration of glucose as an osmoregulatory agent. Such carbonyl compounds include, for example,  
20       the following compounds (Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984)):

- 3-deoxyglucosone
- 5-hydroxymethylfurfural (abbreviated hereafter "5-HMF")
- 25       • formaldehyde
- acetaldehyde
- glyoxal
- methylglyoxal
- levulinic acid
- 30       • furfural
- arabinose

35       In the present invention, a carbonyl compound-trapping agent is used throughout the dialysis, thereby achieving the removal of carbonyl compounds, as listed below, which are accumulated in the blood of a patient with renal failure and are transferred into the peritoneal cavity following peritoneal dialysis, as well as the removal of carbonyl

compounds generated in a peritoneal dialysate during its production process and storage process.

Carbonyl compounds derived from ascorbic acid:

- dehydroascorbic acid

5 Carbonyl compounds derived from carbohydrate, lipid, or amino acid:

- glyoxal

- methylglyoxal

- 3-deoxyglucosone

10 • hydroxynonenal

- malondialdehyde

- acrolein

A preferred carbonyl compound-trapping agent in the present invention is one capable of completely inhibiting or reducing the protein-modification activity of all these carbonyl compounds through a chemical reaction or adsorption; however the carbonyl compound-trapping agent also includes an agent effective merely for major carbonyl compounds among these. For example, methylglyoxal is believed to have a relatively high reactivity among carbonyl compounds (see Thornalley, R.J., Endocrinol. Metab. 3 (1996) 149-166; Inagi, R. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press; and Example 3), and therefore it is of great pathophysiological significance to inhibit the activity of methylglyoxal. Consequently, a compound effective for methylglyoxal can be a preferred carbonyl compound-trapping agent of the present invention. Specifically, as indicated in Examples, compounds such as activated charcoal, guanidine, aminoguanidine, biguanide, cysteine, and albumin are particularly effective carbonyl compound-trapping agents for methylglyoxal.

Although some carbohydrates used as osmoregulatory agents have been reported to be more stable than glucose, it is difficult to completely inhibit the generation of carbonyl compounds from these carbohydrates during heat sterilization and storage processes. Thus, the use of the carbonyl compound-trapping agent is meaningful in situations where carbohydrates other than glucose are used as osmoregulatory agents. Carbohydrates other than glucose usable as osmoregulatory agents in peritoneal dialysis, include, trehalose (JP-A

Hei 7-323084), hydrolyzed starch (JP-A Hei 8-85701), maltitol and lactitol (JP-A Hei 8-131541), as well as non-reducing oligosaccharides and non-reducing polysaccharides (JP-A Hei 10-94598).

Carbonyl compound-trapping agents of the present invention include compounds capable of inhibiting or reducing the damage due to carbonyl compounds towards dialysis patients by a chemical reaction or adsorption, and which per se is safe for the patients. Such compounds include those listed below. The inventive carbonyl compound-trapping agent can be used alone or in combination of two or more types of compounds.

- aminoguanidine (Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))

- $\pm$  2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-yl-acetanilide (OPB-9195; S. Nakamura, 1997; Diabetes 46:895-899)

Further, the carbonyl compound-trapping agent includes, for example, the following compounds or derivatives thereof that are capable of functioning as a carbonyl compound-trapping agent. The "derivatives" indicate compounds having an atomic or molecular substitution(s) at any position as compared with the parental compound.

(1) guanidine derivatives such as methylguanidine (JP-A Sho 62-142114; JP-A Sho 62-249908; JP-A Hei 1-56614; JP-A Hei 1-83059; JP-A Hei 2-156; JP-A Hei 2-765; JP-A Hei 2-42053; JP-A Hei 6-9380; Published Japanese Translation of International Publication 5-505189), etc.

(2) hydrazine derivatives such as sulfonylhydrazine, etc.

(3) 5-membered heterocyclic compounds having 2 nitrogen atoms, such as pyrazolone (JP-A Hei 6-287179), pyrazoline (JP-A Hei 10-167965), pyrazole (JP-A Hei 6-192089; JP-A Hei 6-298737; JP-A Hei 6-298738), imidazolysine (JP-A Hei 5-201993; JP-A Hei 6-135968; JP-A Hei 7-133264; JP-A Hei 10-182460), hydantoin (JP-A Hei 6-135968), etc.

(4) 5-membered heterocyclic compounds having 3 nitrogen atoms, such as triazole (JP-A Hei 6-192089), etc.

(5) 5-membered heterocyclic compounds having a nitrogen atom and a sulfur atom, such as thiazoline (JP-A Hei 10-167965), thiazole (JP-A Hei 4-9375; JP-A Hei 9-59258), thiazoline (JP-A Hei 5-201993; JP-A

Hei 3-261772; JP-A Hei 7-133264; JP-A Hei 8-157473), etc.

(6) 5-membered heterocyclic compounds having a nitrogen atom and an oxygen atom, such as oxazole (JP-A Hei 9-59258), etc.

5 (7) nitrogen-containing 6-membered heterocyclic compounds such as pyridine (JP-A Hei 10-158244; JP-A Hei 10-175954), pyrimidine (Published Japanese Translation of International Publication 7-500811), etc.

10 (8) nitrogen-containing condensed heterocyclic compounds such as indazole (JP-A Hei 6-287180), benzimidazole (JP-A Hei 6-305964), quinoline (JP-A Hei 3-161441), etc.

(9) sulfur- and nitrogen-containing condensed heterocyclic compounds such as benzothiazole (JP-A Hei 6-305964), etc.

(10) sulfur-containing condensed heterocyclic compound such as benzothiophene (JP-A Hei 7-196498), etc.

15 (11) oxygen-containing condensed heterocyclic compounds such as benzopyran (JP-A Hei 3-204874; JP-A Hei 4-308586), etc.

(12) nitrogenous compounds such as carbazoyl (JP-A Hei 2-156; JP-A Hei 2-753), carbazic acid (JP-A Hei 2-167264), hydrazine (JP-A Hei 3-148220), etc.

20 (13) quinones such as benzoquinone (JP-A Hei 9-315960), hydroquinone (JP-A Hei 5-9114), etc.

(14) aliphatic dicarboxylic acids (JP-A Hei 1-56614; JP-A Hei 5-310565)

(15) silicides (JP-A Sho 62-249709)

25 (16) organogermanes (JP-A Hei 2-62885; JP-A Hei 5-255130; JP-A Hei 7-247296; JP-A Hei 8-59485)

(17) flavonoids (JP-A Hei 3-240725; JP-A Hei 7-206838; JP-A Hei 9-241165; WO 94/04520)

30 (18) alkylamines (JP-A Hei 6-206818; JP-A Hei 9-59233; JP-A Hei 9-40626; JP-A Hei 9-124471)

(19) amino acids (Published Japanese Translation of International Publication 4-502611; Published Japanese Translation of International Publication 7-503713)

35 (20) aromatic compounds such as ascochlorin (JP-A Hei 6-305959), benzoic acid (WO 91/11997), pyrrolonaphthyridinium (JP-A Hei 10-158265), etc.

(21) polypeptides (Published Japanese Translation of International Publication 7-500580)

(22) vitamins such as pyridoxamine (WO 97/09981), etc.

(23) SH group-containing compounds such as glutathione, cysteine,  
5 N-acetylcysteine, etc.

(24) SH group-containing proteins such as reduced albumin, etc.

(25) tetracyclines (JP-A Hei 6-256280)

(26) chitosans (JP-A Hei 9-221427)

(27) tannins (JP-A Hei 9-40519)

10 (28) quaternary ammonium ion-containing compounds

(29) biguanide agents such as phenformin, buformin, metformin,  
etc.

(30) ion exchange resins

(31) inorganic compounds such as activated charcoal, silica gel,  
15 alumina, calcium carbonate, etc.

The above compounds include those collectively known as Maillard reaction inhibitors. The Maillard reaction is a non-enzymatic glycation reaction between a reducing sugar such as glucose, and an amino acid or protein. Focusing on a phenomenon of brown coloration  
20 in a mixture consisting of amino acid and reducing sugar upon heating, Maillard reported this reaction in 1912 (Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912)). This Maillard reaction is involved in brown coloration of food during heating or storage, generation of aromatic components and taste, and protein denaturation. Therefore,  
25 this reaction has been mainly studied in the field of food chemistry.

In 1968, glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), a micro fraction of hemoglobin, was identified *in vivo*, which was revealed to increase in patients with diabetes (Rahbar. S., Clin. Chim. Acta, 22: 296 (1968)). These findings helped launch a wave of interest in the significance  
30 of *in vivo* Maillard reaction and the participation of the reaction in the onset of adult diseases such as diabetic complications and arteriosclerosis as well as the progress of aging. Agents inhibiting the *in vivo* Maillard reaction were explored intensively, resulting in the discovery of the above-mentioned compounds as agents inhibiting  
35 the Maillard reaction.

However, it was not known that such Maillard reaction inhibitors

are capable of improving carbonyl-stress state in peritoneal-dialysis patients and inhibit peritoneal dialysis-associated complications caused by carbonyl stress, by eliminating carbonyl compounds derived from the peritoneal dialysate and from the blood.

5       The inventive carbonyl compound-trapping agents include macro-molecular compounds such as ion exchange resins, or inorganic compounds such as activated charcoal, silica gel, alumina, and calcium carbonate, as well as organic compounds represented by the above-mentioned Maillard reaction inhibitors. These compounds are  
10       agents trapping insoluble carbonyl compounds in the peritoneal dialysate by utilizing their carbonyl compound-adsorbing activity. These compounds, though known to be chromatographic carriers, were not known to be useful for improving the carbonyl-stress state.

      Adsorptive blood purifiers using activated charcoal have been  
15       in use for purifying blood in cases of drug poisoning or hepatic coma. They were also used in auxiliary treatment associated with hemodialysis for the removal of various endotoxins, exotoxins, and vasoactive substances that increase at the early stage of acute renal failure in multiple organ failure. However, it has been unknown that adsorptive  
20       blood purifiers are useful for removing carbonyl compounds present in the peritoneal dialysates or carbonyl compounds accumulated in the peritoneal cavity during the dialysis.

      JP-A Sho 58-169458 describes an invention relating to a peritoneal dialysate containing a solid particulate absorbent and a method of  
25       peritoneal dialysis using this peritoneal dialysate. According to the publication, the solid particulate absorbent is added for the purpose of eliminating creatinine and low-molecular-weight metabolites; however, there is no description of effectiveness of the absorbent for the elimination of the carbonyl compounds accumulated  
30       in the peritoneal dialysate or in the peritoneal cavity during dialysis. Further, the publication does not indicate nor suggest that the carbonyl-stress state of peritoneal-dialysis patients can be improved by the method of peritoneal dialysis.

      The composition of the peritoneal dialysate used as a base to  
35       which the inventive carbonyl compound-trapping agent is added, may be any conventional dialysate. A peritoneal dialysate generally



comprises an osmoregulatory agent, a buffering agent, and an inorganic salt. The sugars as listed above are used as osmoregulatory agents. In view of the stability of glucose, a buffer agent giving acidic pH (pH 5.0-5.4) is frequently used. Of course, when the osmoregulatory agent is not glucose, the buffering agent can be suitably selected to give a more physiological pH (pH of around 7.0). Alternatively, a product form has been designed, in which the buffering agent that adjusts pH at the time of use is packaged separately, allowing the use of both glucose and a neutral pH. In the present invention, carbonyl compounds generated in the processes of heat sterilization and long-term storage are eliminated, enabling the preferable use of a buffer system capable of giving neutral pH. Such a formulation has previously been difficult because of the degradation of glucose. A peritoneal dialysate generally contains inorganic salts such as sodium chloride, calcium chloride, or magnesium chloride. These salts bring peritoneal dialysates closer to physiological conditions, and are expected to give greater biocompatibility.

The inventive carbonyl compound-trapping agent can be added to a peritoneal dialysate of a known composition at the time of formulation, and the formulated and sealed dialysate can be sterilized by heating. It is expected that the addition of the agent sufficiently prevents the generation of carbonyl compounds from the major constituents during heat sterilization. Alternatively, the peritoneal dialysate is placed in a compartmentalized container comprising a first compartment and a second compartment; a reducing sugar is placed in the first compartment and the carbonyl compound-trapping agent is placed in the second compartment, and the two are mixed immediately before use. In this case, carbonyl compounds generated in the processes of sterilization and storage immediately bind to the carbonyl compound-trapping agent mixed. The excess carbonyl compound-trapping agents also trap blood-derived carbonyl compounds, after being administered into the peritoneal cavity. A single carbonyl compound-trapping agent or a combination of multiple trapping agents may be added to the peritoneal dialysate.

There can be many types of methods for contacting a peritoneal dialysate with a carrier on which a carbonyl compound-trapping agent

is immobilized, or with carbonyl compound-trapping agents that are insoluble in the peritoneal dialysate. For example, the peritoneal dialysate is enclosed in a container where the carbonyl compound-trapping agent is immobilized inside, or in a container carrying a carbonyl compound-trapping agent immobilized on particulates or fibrous carriers, thereby trapping carbonyl compounds that generate and accumulate during storage. In the latter system, the insoluble carriers can be separated from the peritoneal dialysate by filtration. Alternatively, a carbonyl compound-trapping cartridge is prepared by filling a column with carrier beads or fibrous carriers on which the carbonyl compound-trapping agent is immobilized, or with a carbonyl compound-trapping agent which per se is insoluble in the peritoneal dialysate. Then, the peritoneal dialysate is contacted with the carrier in the cartridge, and then the fluid is infused into the peritoneal cavity. It is preferred that distilled water is pre-filled in the cartridge to prevent air bubbles at the start of peritoneal dialysis. When the carbonyl compound-trapping cartridge is contacted with the peritoneal dialysate at the time of peritoneal infusion, although it is impossible to remove patient-derived carbonyl compounds that accumulate in the fluid during the dialysis, carbonyl compounds originally present in the dialysate can be eliminated. Alternatively, when peritoneal dialysis treatment is conducted by using a closed circuit where the peritoneal dialysate is circulated by a small circulating pump, it is possible to attain the removal of not only carbonyl compounds originally present in the dialysate but also those that accumulate in the peritoneal cavity during dialysis, by installing within the circuit, the above-mentioned carbonyl compound-trapping cartridge containing carriers with immobilized carbonyl compound-trapping agent.

There is no particular restriction on the carrier that is used for immobilizing the inventive carbonyl compound-trapping agent, as long as the carrier is harmless to the human body and is sufficiently safe and stable as a material that is directly in contact with the peritoneal dialysate. The carriers include, for example, synthetic or naturally-occurring organic macro-molecular compounds, and inorganic materials such as glass beads, silica gel, alumina, and

activated charcoal, as well as these materials coated with a polysaccharide or synthetic polymer. Conventional modifications, reformations or denaturations can improve the permeability, drug compatibility, protective strength, adsorption capacity, or carbonyl compound specificity of the carries on which the carbonyl compound-trapping agent is immobilized, or the carbonyl compound-trapping agent, which per se is insoluble in the peritoneal dialysate.

A carrier comprising a macromolecule is exemplified by a polymethyl methacrylate polymer, polyacrylonitrile polymer, polysulfone polymer, vinyl polymer, polyolefin polymer, fluorine polymer, polyester polymer, polyamide polymer, polyimide polymer, polyurethane polymer, polyacryl polymer, polystyrene polymer, polyketone polymer, silicon polymer, cellulose polymer, chitosan polymer; specifically, polysaccharides such as agarose, cellulose, chitin, chitosan, sepharose, dextran, etc. and derivatives thereof, and polyester, polyvinyl chloride, polystyrene, polysulfone, polyethersulfone, polypropylene, polyvinyl alcohol, polyarylether sulfone, polyacrylic ester, polymethacrylic ester, polycarbonate, acetylated cellulose, polyacrylonitrile, polyethylene terephthalate, polyamide, silicone resin, fluororesin, polyurethane, polyetherurethane, and polyacrylamide and derivatives thereof. The macromolecular material can be used alone or in a combination of two or more types of macromolecules. In the latter case, at least one of the macromolecules bears the carbonyl compound-trapping agent immobilized on it. The immobilized carbonyl compound-trapping agent is used alone or in a combination of two or more types of compounds. The above-mentioned polymer material may be a polymer comprising a single type of monomer or a copolymer comprising multiple types of monomers. Further, the material may be treated by the addition of an appropriate modifier, or may be subjected to denaturation treatment such as radiation cross-linking or cross-linking using peroxide.

There is no restriction on the shape of carrier. For example, the carrier can be membranous, fibrous, granular-shaped, hollow fiber-like, non-woven fabric-like, porous, or honeycomb-shaped. The carrier's area of contact with the peritoneal dialysate can be

controlled by varying the thickness, surface area, diameter, length, shape, and/or size of the carrier. Further, the carbonyl compound-trapping agent can be immobilized on the inner wall of container, where the peritoneal dialysate is placed, and also within  
5 the circuit where the peritoneal dialysate is circulated.

The carbonyl compound-trapping agent can be immobilized on the above-mentioned carrier by using known methods, such as physical adsorption, specific biochemical binding reaction, ion binding, covalent bonding, grafting, etc. If necessary, a spacer can be inserted  
10 between the carrier and the carbonyl compound-trapping agent. When the carbonyl compound-trapping agent exhibits toxicity, the amount released becomes a vital issue. Thus, it is preferred that the carbonyl compound-trapping agent is immobilized on the carrier by covalent bonding so as to minimize the released amount. Functional groups in  
15 the carrier are utilized for covalently bonding the carbonyl compound-trapping agent thereto. The functional group is, for example, hydroxyl group, amino group, aldehyde group, carboxyl group, thiol group, silanol group, amide group, epoxy group, succinylimino group, etc.; however, the functional group is not limited to these  
20 groups. The covalent bond is, for example, ester linkage, ether linkage, amino linkage, amid linkage, sulfide linkage, imino linkage, disulfide linkage or the like.

A commercially available product, for example polystyrene carrier having sulfonylhydrazine groups (PS-TsNHNH<sub>2</sub>, ARGONAUT TECHNOLOGIES  
25 CO.), can be used as a carrier for immobilizing carbonyl compound-trapping agent.

The carrier with the immobilized carbonyl compound-trapping agent of the present invention can be sterilized by an appropriate sterilization method selected from publicly known sterilization  
30 methods depending upon the types of carbonyl compound-trapping agent and carrier used. The sterilization method includes, for example, high-pressure steam sterilization, gamma-ray irradiation sterilization, gas sterilization, etc. A cartridge, which is filled with the insoluble carbonyl compound-trapping agent or carrier with  
35 immobilized carbonyl compound-trapping agent, is connected with a container containing the peritoneal dialysate to simultaneously

sterilize both the cartridge and container.

The carbonyl compound may be insufficiently eliminated from the peritoneal dialysate when only a small amount of carbonyl compound-trapping agent is in contact with the peritoneal dialysate.

5 In general, it is hard to predict the quantity of carbonyl compound present in the peritoneal dialysis. Accordingly, the carbonyl compound-trapping agent is used as much as possible without compromising the safety in patients so as to maintain the maximal effect. The dose of carbonyl compound-trapping agent can be controlled  
10 by altering the amount of carbonyl compound-trapping agent immobilized on the carrier or by altering the amount of carrier on which the carbonyl compound-trapping agent is immobilized at the time of use.

The carbonyl compound-trapping agent can also be infused into the peritoneal dialysis circuit through an appropriate mixing  
15 connector installed in the circuit. In this case, the carbonyl compound generated during sterilization and storage processes is trapped within the circuit.

Further, the carbonyl compound-trapping agent can be directly administered into the peritoneal cavity and mixed with the peritoneal  
20 dialysate in the peritoneal cavity. In this case, carbonyl compounds derived from the peritoneal dialysate and from the blood are inactivated in the peritoneal cavity.

Furthermore, prior to the infusion of peritoneal dialysate to a patient, or while the fluid is dwelling in the peritoneal cavity,  
25 the carbonyl compound-trapping agent is administered to the peritoneal-dialysis patient by intravenous injection or the like, thereby successfully achieving the improvement of carbonyl-stress state in the peritoneal cavity.

Preferred embodiments of the inventive peritoneal dialysate are  
30 specifically described below.

The composition of the base dialysate is generally as follows.

Glucose	1-5%w/v
Sodium ion	100-150 meq
Potassium ion	0-0.05 meq
Magnesium ion	0-2 meq
Calcium ion	0-4 meq

35

Chloride ion 80-150 meq

Buffering agent 10-50 mM

(organic acids such as lactic acid, citric acid, malic acid, acetic acid, pyruvic acid, and succinic acid)

- 5 This is only a general formula, and a more suitable composition is selected depending on the symptoms of the patient.

The inventive carbonyl compound-trapping agent is added in an effective amount to the above-indicated basic formula. For example, when aminoguanidine is used, the concentration is 1 mM or higher, preferably 10 mM or higher, more preferably 10 mM or higher but not higher than 100 mM. If the amount of carbonyl compound-trapping agent added is small, they might be used up for the carbonyl compounds generated in the processes of production and storage. As a consequence, the trapping agent is unable to treat carbonyl compounds transferred to the dialysate from the blood and tissues of a patient during dialysis. Particularly, it is hard to predict the quantity of carbonyl compounds transferred from the blood and tissues to the dialysate. Accordingly, the carbonyl compound-trapping agent is used as much as possible without compromising the safety of a patient so as to maintain the maximal effect. It has been known that aminoguanidine exhibits only a low toxicity to animals. According to "Registry of Toxic Effect of Chemical Substances" (1978), the half-lethal dose of aminoguanidine, which is subcutaneously administered, is 1258 mg/kg in rat, or 963 mg/kg in mouse. This compound is water-soluble. OPB-9195 can also be added similarly, to a concentration of 1 mM or higher, preferably 10 mM or higher, more preferably 10 mM or higher, but not higher than 100 mM.

The inventive peritoneal dialysate as formulated above is filled in an appropriate closed container, and subjected to sterilization. An effective sterilization includes heat sterilization such as high-pressure steam sterilization, and hot water sterilization. In this case, it is important to use a container that releases no toxic substances at a high temperature, and has enough strength to bear transportation after sterilization. A specific example of such a container is a flexible plastic bag made of polyvinyl chloride, polypropylene, polyethylene, polyester, or ethylene-vinyl acetate

copolymer. Further, to avoid the deterioration of the fluid resulting from the influence of the outside air, the container filled with the peritoneal dialysate may be packaged using a high gas barrier packaging material.

5        Filter sterilization can be selected in place of heat sterilization. For example, the fluid is sterilized by filtration using a precision filter device with a membrane of about 0.2- $\mu$ m pore size. This method is free of the generation of carbonyl compounds that result during heating. The filter-sterilized peritoneal  
10        dialysate is filled into a container such as a flexible plastic bag and then sealed. Because the series of processes from sterilization to transportation does not differ from the preparation of current dialysates, the inventive peritoneal dialysate can also be manufactured by a procedure comprising similar steps.

15        When the sterilization is achieved by heat sterilization including high-pressure heat sterilization, as long as the carbonyl compound-trapping agent used is sufficiently stable to a treatment such as heating, the trapping agent may be added when the peritoneal dialysate is formulated, prior to the heat sterilization process.  
20        This procedure reduces the generation and accumulation of dialysate-derived carbonyl compounds during heating. Of course, the carbonyl compound-trapping agent also functions to reduce the generation and accumulation of carbonyl compounds during storage and peritoneal dialysis.

25        When the carbonyl compound-trapping agent used is unstable to heat sterilization, it can be sterilized by a method that does not require heating. Such sterilization methods include, for example, filter sterilization. Alternatively, the carbonyl compound-trapping agent may be added to a sterilized peritoneal dialysate. There is  
30        no particular limitation on the timing of addition. For example, the carbonyl compound-trapping agent is preferably added to the fluid after sterilization, because in this case, the trapping agent can suppress not only the generation of carbonyl compounds during peritoneal dialysis, but also the generation and accumulation of  
35        carbonyl compounds in the peritoneal dialysate during the storage prior to dialysis.

Alternatively, the carbonyl compound-trapping agent can be added immediately before peritoneal dialysis treatment or at the time of treatment. For example, the base solution and the carbonyl compound-trapping agent are placed separately in the above-mentioned flexible plastic bags and such, before the treatment, and then, the two are mixed together in sterile conditions at the start of peritoneal dialysis. To achieve this, a flexible plastic bag as disclosed in Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Sho 63-19149, which comprises two compartments separated by a removable partition, is suitably used.

Alternatively, a connector for mixing is installed in the peritoneal dialysis circuit, and the carbonyl compound-trapping agent can be infused through the connector.

This type of preparation procedure for peritoneal dialysates can be used to prepare heat-stable carbonyl compound-trapping agents as well as heat-unstable carbonyl compound-trapping agents.

Further, when peritoneal dialysis is conducted by circulating the peritoneal dialysate in a closed circuit with a small circulating pump, a filter device filled with the carbonyl compound-trapping agent may be installed anywhere in the circuit.

The peritoneal dialysate of the present invention can be used for a peritoneal dialysis treatment similar to a treatment using currently used peritoneal dialysates. Specifically, a suitable amount of the inventive peritoneal dialysate is infused into the peritoneal cavity of a patient, and low-molecular weight constituents present in the body are allowed to transfer into the peritoneal dialysate through the peritoneum. The peritoneal dialysate is circulated intermittently, and the treatment is further continued depending on the symptoms of the patient. During this period, the carbonyl compounds, as well as other substances such as creatinine, inorganic salt, and chloride ion, transfer to the peritoneal dialysate from blood and from inside the peritoneum. At the same time, the toxic activity of carbonyl compounds is eliminated by the carbonyl compound-trapping agent, thereby rendering the compounds harmless.



### Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the amounts of carbonyl compounds present in peritoneal dialysates and the effluent fluids.

Figure 2 shows a photograph of histological localization of carbonyl-modified proteins in the peritoneal tissue of a peritoneal-dialysis patient (in the top panel) and the corresponding schematic illustration (in the bottom panel). In this figure, A indicates positive areas in the connective tissues, on which mesothelial cells had been present but have been removed; B indicates positive areas on the thickened vascular wall.

Figure 3 shows VEGF mRNA expression in mesothelial cells exposed to glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone. Reverse transcription was performed on total RNA from cultured rat mesothelial cells incubated with various concentrations (0, 100, 200, and 400  $\mu$ M) of glyoxal (A), 3-deoxyglucosone (B), or methylglyoxal (C). VEGF and G3PDH cDNAs were amplified by PCR for 30 and 21 cycles, respectively. Experiments were performed in triplicate to calculate averages. Ratio of VEGF mRNA to G3PDH mRNA was calculated for the average of each experiment. The average  $\pm$  S.D. of the three experiments is illustrated in the figure. \* $P < 0.0005$ .

Figure 4 shows VEGF protein production in microvascular endothelial cells exposed to methylglyoxal. Human endothelial cells were cultured in the presence of various concentrations (0, 200, and 400  $\mu$ M) of methylglyoxal, and VEGF protein released into culture supernatant was quantified by ELISA. Representative data from the three experiments are shown. The data are expressed as mean  $\pm$  range. \* $P < 0.05$ , and \*\* $P < 0.01$ .

Figure 5 shows VEGF mRNA expression in endothelial cells exposed to methylglyoxal. Human endothelial cells were cultured in the presence of various concentrations (0, 100, 200, and 400  $\mu$ M) of methylglyoxal. VEGF and G3PDH cDNAs were amplified by PCR for 30 and 21 cycles, respectively. Experiments were performed in triplicate to calculate mean values. Ratio of VEGF mRNA to G3PDH mRNA was calculated for the mean of each experiment. The mean  $\pm$  S.D. of the three experiments is illustrated in the figure. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , and \*\*\* $P < 0.0001$ .

Figure 6 shows VEGF mRNA expression in peritoneal tissues of rats given daily intraperitoneal loads of methylglyoxal for 10 days. VEGF and G3PDH mRNA expressed in peritoneums were amplified by RT-PCR for 28 and 16 cycles, respectively. Experiments were performed in triplicate to calculate mean values. Ratio of VEGF mRNA to G3PDH mRNA was calculated for the mean of each experiment. The mean  $\pm$  S.D. of the three experiments is illustrated in the figure. \*P<0.05.

Figure 7 shows the generation process of carbonyl stress in the peritoneal cavity of peritoneal-dialysis patient.

Figure 8 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the generation of pentosidine following the incubation of the peritoneal dialysis effluent.

Figure 9 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the generation of protein carbonyl following the incubation of the peritoneal dialysis effluent.

Figure 10 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the amounts of carbonyl compounds present in peritoneal-dialysis (CAPD) effluents from three peritoneal-dialysis patients (patient I, patient S, and patient K).

Figure 11 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the generation of 5-HMF within the peritoneal dialysate in an acidic pH range.

Figure 12 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the generation of 5-HMF within the peritoneal dialysate in a neutral pH range.

Figure 13 shows the effect of the addition of aminoguanidine on the amounts of carbonyl compounds within the peritoneal dialysate in acidic and neutral pH ranges.

Figure 14 shows the suppressing effect of carbonyl compound-trapping beads added to the peritoneal dialysate on the generation of pentosidine.

Figure 15 shows the carbonyl compound-eliminating effect of carbonyl compound-trapping beads added to the peritoneal dialysate.

Figure 16 shows the carbonyl compound-eliminating effect of activated charcoal added to a dicarbonyl compound solution.

Figure 17 shows the carbonyl compound-eliminating effect of

activated charcoal added to the peritoneal dialysate.

Figure 18 shows the trapping activity of guanidine for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 19 shows the trapping activity of metformin, which is a biguanide, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 20 shows the trapping activity of buformin, which is a biguanide, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 21 shows the trapping activity of phenformin, which is a biguanide, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 22 shows the trapping activity of aminoguanidine for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 23 shows the trapping activity of cysteine, which is an SH compound, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 24 shows the trapping activity of N-acetylcysteine, which is an SH compound, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 25 shows the trapping activity of GSH, which is an SH compound, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 26 shows the trapping activity of albumin, which is an SH compound, for glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone.

Figure 27 shows the suppressing effect of SH compounds added to the peritoneal dialysate on the generation of pentosidine.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is illustrated more specifically below with reference to examples, but is not to be construed as being limited thereto.

#### Example 1. Measurement of the amount of carbonyl compounds present in the peritoneal dialysate and peritoneal dialysate effluent

In order to demonstrate the generation of carbonyl stress in the peritoneal cavity, the amount of carbonyl compounds present in the peritoneal dialysate effluent was measured according to the following experiment method.

##### (i) Measurement of carbonyl compounds

After the peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; Dianeal PD-2 2.5) had been administered to a peritoneal-dialysis patient and had been

allowed to dwell in the peritoneal cavity overnight, the peritoneal dialysate effluent was collected from the patient. Aliquots (400  $\mu$ l) of both the peritoneal dialysate and the peritoneal dialysate effluent were separately mixed with a 400- $\mu$ l solution of 0.5 N hydrochloric acid containing 1.5 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), and the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes to react the carbonyl compound with 2,4-DNPH. Subsequently, an aqueous solution of 1 M acetone (40  $\mu$ l) was added to the mixture, which was then stirred at room temperature for 5 minutes to remove excess 2,4-DNPH. The mixture was washed three times with 400  $\mu$ l of n-hexane. The aqueous layer was recovered and the absorbance thereof was measured at 360 nm in a spectrophotometric microplate reader (Nippon Molecular Devices Co.; SPECTRAMax250).

(ii) Preparation of calibration curve

Aqueous solutions of various glucose concentrations were prepared and the amounts of carbonyl compounds derived from glucose were measured by the same method as described in (i). A calibration curve of glucose concentration vs. concentration of carbonyl compound was prepared based on this experiment.

(iii) Quantification of carbonyl compounds

Respective glucose concentrations of the peritoneal dialysate and peritoneal dialysate effluent were measured by using a glucose assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Glucose CII-Test Wako). The amount of carbonyl compounds derived from glucose was estimated by using the calibration curve. The amount of carbonyl compounds in the fluids was determined by subtracting the amount of glucose-derived carbonyl compounds from the total amount of carbonyl compound in the sample solutions.

The result obtained is shown in Fig. 1. The peritoneal dialysate effluent, which had dwelled overnight in the peritoneal cavity, contained five times more carbonyl compounds than the peritoneal dialysate prior to the administration did. This indicates the transfer of carbonyl compounds from the blood into the peritoneal cavity.

Example 2. Histological localization of carbonyl-modified proteins in the peritoneum of a peritoneal-dialysis patient

The localization of carbonyl compounds in peritoneal tissues of a peritoneal-dialysis patient was studied by immunostaining using malondialdehyde as the index.

Peritoneal tissues from a peritoneal-dialysis patient (50-year-old male with a five-year history of peritoneal dialysis) were processed by immunostaining according to the method of Horie et al. (Horie, K. et al., J. Clin. Invest., 100, 2995-3004 (1997)). The primary antibody used was a mouse anti-malondialdehyde monoclonal antibody. The results showed that intense positive signals were present in the connective tissue under removed mesothelial cells, and the signals were also present on the thickened vascular wall (Fig. 2).

Malondialdehyde (MDA) is a carbonyl compound, which is generated by the degradation of peroxide lipid. Therefore, immunostaining was carried out by using antibodies against 4-hydroxy-2-nonenal, a degradation product of peroxide lipid other than MDA, and against carboxymethyllysine and pentosidine, which are generated by the oxidation of saccharides. The results showed that the positive signals were localized in the same areas as those shown in Fig. 2. These indicate that, in the peritoneal tissues of peritoneal-dialysis patients, proteins are modified in association with the enhancement of carbonyl stress caused by the presence of degradation products of peroxide lipids and carbonyl compounds generated by the oxidation of saccharides.

Example 3. Peritoneal cell damages by methylglyoxal

Decreased ultrafiltration of peritoneum by long-term peritoneal dialysis has been taken as evidence for an augmentation of the peritoneal surface area available for diffusive exchange (Krediet RT, Kidney Int, 55: 341-356 (1999); Heimbürger O et al., Kidney Int, 38: 495-506 (1990); Imholz AL et al., Kidney Int, 43: 1339-1346 (1993); Ho-dac-Pannekeet M et al., Perit Dial Int, 17: 144-150 (1997)). Namely, glucose in peritoneal dialysate flows out of peritoneal cavity by diffusion, thereby decreasing the dialytic function according to

osmotic pressure gradient. An increased vascular surface area within the peritoneum might also account for this. In addition, the vascular endothelial growth factor (VEGF) might play a critical role in this pathology. VEGF increases vascular permeability (Senger DR et al., Science 219: 983-985 (1983); Connolly DT et al., J Biol Chem, 264: 20017-20024 (1989)), stimulates nitric oxide (NO) synthesis and vasodilation (Hood JD et al., Am J Physiol, 274: H1054-1058 (1998)), and induces inflammatory responses (Clauss M et al., J Exp Med, 172: 1535-1545 (1990); Melder RJ et al., Nat Med, 2: 992-997 (1996)). Furthermore, VEGF is a powerful angiogenic factor contributing to the recovery from vascular lesions (Thomas KA, J Biol Chem, 271: 603-606 (1996); Ferrara N et al., Endocr Rev, 18: 4-25 (1997); Shoji M et al., Am J Pathol, 152: 399-411 (1998)). Consequently, effects of glucose degradation products contained in dialysate on VEGF production were examined.

### <3-1> VEGF expression in peritoneum mesothelial and vascular endothelial cells cultured in the presence of glucose degradation products

Peritoneum was obtained from 6-week-old male CD (SD) IGS rats (Charles-River, Kanagawa, Japan). Mesothelial cells were isolated based on the method of Hjelle et al. (Hjelle JT et al., Perit Dial Int, 9: 341-347 (1989)) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. The mesothelial cells at passage 7 to 10 were cultured for 3 hours in a CO<sub>2</sub> incubator in the presence of various concentrations of glucose degradation products (glyoxal, methylglyoxal (Sigma, St. Louis, MO), or 3-deoxyglucosone (kindly provided from Fuji Memorial Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Kyoto, Japan). The expression of VEGF mRNA was analyzed by semiquantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from the mesothelial cells using Rneasy Mini Kit (Qiagen, Germany). Five micrograms of the RNA was reverse-transcribed using oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) with 200 units of RNase H-free reverse transcriptase (Superscript II: Gibco BRL) and PCR amplification was performed as described previously (Miyata T et al., J Clin Invest, 93: 521-528 (1994)). The sequences of the primers used for the amplification of rat VEGF were 5'-ACTGGACCCTGGCTTTACTGC-3'

(SEQ ID NO: 1) and 5'-TTGGTGAGGTTTGATCCGCATG-3' (SEQ ID NO: 2). The amplified product was 310 bp long. The primers used for the amplification of rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) were 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGCCC-3' (SEQ ID NO: 3) and 5'-GATGTCATCATATTTGGCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 4) and amplified a 322 bp fragment. The G3PDH served as an internal RNA control to allow comparison of RNA levels among different specimens. Specimens were amplified in a DNA Thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) to determine the suitable number of cycles consisting of 0.5 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 1.5 min at 72°C. In preliminary experiments, reverse transcription and PCR amplification were performed on various amounts of RNA for 16, 18, 21, 25, 28, 31, and 34 cycles. These experiments showed that, with 30 cycles of amplification for VEGF mRNA and with 21 cycle of G3PDH mRNA amplification, PCR product signals were quantitatively related to input RNA. PCR products resolved by electrophoresis in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide were quantified by measuring the signal intensity with a quantification program (NIH image). Experiments were performed for each glucose degradation product concentration. Messenger RNA was determined in triplicate and the results were averaged for each experiment. A total of 3 to 4 independent experiments were performed for each experimental condition. The results were averaged and expressed as mean  $\pm$  S.D. The statistical significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA). If a significant difference was indicated by this analysis, results obtained with different concentrations of methylglyoxal were compared by Scheffe's t-test.

At concentrations varying from 0 to 400  $\mu$ M, neither glyoxal nor 3-deoxyglucosone modified VEGF expression (Figs. 3A and 3B). Only methylglyoxal stimulated VEGF mRNA expression at a concentration of 400  $\mu$ M ( $P < 0.0005$ ) (Fig. 3C). The sample RNAs that had not been reverse-transcribed did not yield the PCR product. All cells remained viable. Mesothelial cells were also cultured in the presence of higher concentrations of 3-deoxyglucosone (0.625, 2.5, and 5 mM), showing a decreased viability (cell viability was 80, 55, and 8% in the presence of 0.625, 2.5, and 5 mM 3-deoxyglucosone, respectively). Because of the decreased viability, VEGF mRNA expression could not be measured.

As a consequence of these observations, only methylglyoxal was used in the subsequent experiments.

The release of VEGF protein into the culture supernatant was measured by ELISA for mesothelial cells cultured for 24 hours in the presence of various concentrations of methylglyoxal. Human microvascular endothelial cells were purchased from Kurabo (Osaka, Japan) and cultured in VEGF-depleted EGM-2 medium (Takara, Tokyo, Japan). The cells were incubated with methylglyoxal in the same manner as rat peritoneum mesothelial cells. The VEGF protein in the culture supernatant prepared in duplicate was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a kit (Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the attached manual. The experiment was repeated three times. The results were statistically analyzed as described above.

As a result, addition of methylglyoxal to the medium resulted in a dose-dependent increase of VEGF (Fig. 4). No VEGF release was detected during in the absence of methylglyoxal. Namely, at protein level, methylglyoxal also dose-dependently stimulates the production and release of VEGF.

VEGF mRNA expression was then assessed in endothelial cells cultured in the presence of various concentrations (0 to 400  $\mu$ M) of methylglyoxal. Experiments were performed as those for rat mesothelial cells. However, primers used for human VEGF amplification were 5'-GGCAGAATCATCACGAAGTGGTG-3' (SEQ ID NO: 5) and 5'-CTGTAGGAAGCTCATCTCTCC-3' (SEQ ID NO: 6). The amplified fragment was 271 bp long. The same primers were used for human and rat G3PDH amplifications. The analyses revealed that VEGF mRNA expression rose in a dose-dependent manner (Fig. 5).

<3-2> VEGF expression in peritoneal tissues of rats given intraperitoneal injection of methylglyoxal

To further assess the biological effects of methylglyoxal on VEGF mRNA expression in the peritoneum *in vivo*, rats were given various amounts of methylglyoxal into their peritoneal cavity for 10 days. Six-week-old male CD (SD) IGS rats were given a daily intraperitoneal injection of 50 ml/kg of a saline solution containing various concentrations of methylglyoxal for 10 days. Peritoneum was isolated



from the parietal walls and investigated for VEGF mRNA expression. Experiments were performed as the above-mentioned *in vitro* experiments for rat mesothelial cells. However, mRNA was extracted from peritoneal tissues with ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan). In addition, PCR amplification was performed for 28 cycles for VEGF mRNA and for 16 cycles for G3PDH mRNA.

As shown in Fig. 6, VEGF mRNA expression in samples of the parietal peritoneum increased significantly ( $P < 0.05$ ) according to methylglyoxal concentration. On optical microscopy, the peritoneal tissue was unaffected: the number of vessels, the vascular wall, the interstitium, and mesothelial cells remained normal.

<3-3> VEGF and carboxymethyllysine (CML) immunostaining of peritoneal tissue of long-term peritoneal dialysis patients

The distribution of VEGF and carboxymethyllysine was examined by immunohistochemistry in the peritoneal tissues of nine peritoneal dialysis patients. Carboxymethyllysine is derived from glucose degradation products such as glyoxal and 3-deoxyglucosone (Miyata *et al.*, *Kidney Int*, 55: 389-399 (1999)). An anti-carboxymethyllysine antibody was therefore used as a marker of glucose degradation product-modified proteins.

Peritoneal tissues were isolated, after obtaining informed consent, from nine non-diabetic peritoneal dialysis patients during catheter reinsertion (Table 1). Reinsertion was necessitated by catheter failure due to damage, incorrect position, and/or obstruction. No patients suffered from peritonitis. Normal peritoneal tissue was obtained, during abdominal surgery, from two male subjects (48 and 58 years old) with normal renal function.

Two- $\mu$ -thick peritoneal tissue sections were mounted on slides coated with 3-aminopropyltriethoxy silane (Sigma), deparaffined, rehydrated in distilled water, and incubated with a buffer solution (0.05 M Tris-HCl (pH 7.2), 0.1 M NaCl) containing Pronase (0.5 mg/ $\mu$ l: Dako, Glostrup, Denmark) for 15 min at room temperature. The slides were washed with PBS containing 0.5% Tween 20, blocked in 4% skim milk for 2 hours, and subsequently incubated with anti-VEGF rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-AGE mouse IgG (Ikeda *K et al.*, *Biochemistry*, 35: 8075-8083 (1996)), the epitope

of which was carboxymethyllysine (Miyata T et al., Kidney Int, 51: 1170-1181 (1997)), overnight in humid chambers at 4°C. The sections were washed and incubated with 1:100 diluted goat anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase or goat anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (Dako) for 2 hours at room temperature, followed by the detection with 3,3'-diaminobenzidine solution containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Periodic acid-Schiff staining was also performed for histological analysis. Immunostaining was independently evaluated for signal intensity and distribution by two observers.

Results are shown in Table 1. In the table, "normal1" and "normal2" indicate samples derived from the subjects with normal renal function and "PD1" to "PD9" indicate samples derived from peritoneal dialysis patients. In the pictures of the peritoneal tissue of a representative long-term peritoneal dialysis patient (PD6 in Table 1), interstitial fibrosis, and thickening and hyalinosis of vascular walls were observed. Both VEGF and carboxymethyllysine co-localized in the mesothelial cells and vascular walls. In mesothelial layer, the signal with VEGF was weaker than that with carboxymethyllysine. Results were similar for the eight other patients. In the normal peritoneal sample (normal2 in Table 1), in contrast with peritoneal dialysis samples, VEGF was present only in the vascular walls but was absent in the mesothelial layer. Carboxymethyllysine was absent in the mesothelial layer and the signal was very weak in the vascular walls. Observations were similar in another control normal sample. No immunostaining was observed when normal mouse IgG was used. Thus, the fact that VEGF expression in the mesothelial layers and its co-localization with carboxymethyllysine are observed only in peritoneal dialysis patients suggests that the glucose degradation products present in peritoneal dialysate actually enhance VEGF production in uremic patients through peritoneal dialysis.

Table 1 . Immunohistochemical detection of CML and VEGF in peritoneal tissues of PD patients

Samples	Gender	Age (yr)	PD duration (months)	CML		VEGF	
				mesothelial layer	vascular walls	mesothelial layer	vascular walls
normal1	M	48	-	-	±	-	+
normal2	M	58	-	-	±	-	+
PD1	F	53	3	+	+	+	+
PD2	M	44	4	+	+	+	+
PD3	M	43	45	+	+	+	+
PD4	F	54	60	++	++	++	+
PD5	M	52	70	++	++	+	+
PD6	M	51	90	++	++	++	++
PD7	M	45	105	++	++	++	++
PD8	M	62	108	++	++	++	++
PD9	M	66	110	++	++	++	++

-: negative, ±: faint, +: positive, ++: strongly positive

The results mentioned above confirm that peritoneal dialysis patients are in carbonyl-stress state because of glucose degradation products or the like in peritoneal dialysate and further demonstrate for the first time that methylglyoxal enhances VEGF production in peritoneal cells. This suggests that at least a part of causes for decrease of peritoneal permeability by glucose degradation products contained in peritoneal dialysate is enhancement of VEGF production and angiogenic stimulation accompanied with it.

#### Example 4. Effect of a carbonyl compound-trapping agent added to dialysate effluents from peritoneal-dialysis patients

<4-1>

Pentosidine is an AGE structure, which has been seen to accumulate 20 times more in the blood of patients with renal failure compared to normal healthy persons (Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206 (1996)). The inventors tested how aminoguanidine addition influenced the increase of pentosidine and carbonyl group on proteins (protein carbonyl) when the fluid effluent from a peritoneal-dialysis patient was incubated at 37°C.

An effluent from a peritoneal-dialysis patient, which had been kept overnight, was centrifuged, and the resulting supernatant was

sterilized by filtration (pore size; 0.45  $\mu$ m). Aminoguanidine (Tokyo Kasei Kogyo Co.) was added to the fluid at a final concentration of 0, 1, 10, or 100 mM. The mixture was incubated at 37°C. The incubation period was 1 to 2 when assaying pentosidine, and 2 weeks when assaying protein carbonyl. The quantitative assay for pentosidine was performed using HPLC (SHIMADZU Co.; LC-10A) after the hydrolysis of proteins in 6 N HCl at 110°C (T. Miyata et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol, 7:1198-1206; T. Miyata et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2353-2358). The quantitative determination of protein carbonyl was carried out by measuring the absorbance (Nippon Molecular Devices Co.; SPECTRAMax 250) of hydrazone generated by the reaction of a carbonyl group after incubation with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233, 346-357 (1994)).

Based on the experimental result, aminoguanidine was shown to inhibit the generation of pentosidine in a concentration-dependent manner (Fig. 8). Aminoguanidine exhibited a similar inhibiting effect on the generation of protein carbonyl in a concentration-dependent manner (Fig. 9).

<4-2> Next, aminoguanidine was tested for its effect on the amounts of carbonyl compounds other than glucose present in a fluid that was kept overnight in a peritoneal-dialysis patient, according to the following experiment method.

#### (A) Incubation of the peritoneal dialysate effluent

The peritoneal dialysate effluent was recovered from the patient and filtered with a filter with a pore size of 0.45  $\mu$ m. Aminoguanidine (Tokyo Kasei Kogyo Co.) was added to the fluid at a concentration of 0, 10, 50, or 250 mM to prepare a sample solution. An aliquot (1 ml) of the sample solution was added into a plastic tube with a screw cap, and the tube was incubated at 37°C for 15 hours. The sample solutions were stored at -30°C prior to the incubation.

#### (B) Quantification of carbonyl compounds

##### (i) Assay for carbonyl compounds present in sample solutions

Each of 400- $\mu$ l aliquots of sample solutions was mixed with a 400- $\mu$ l solution of 0.5 N hydrochloric acid containing 1.5 mM 2,4-DNPH (Wako

Pure Chemical Industries, Ltd.), and then, the mixture was stirred at room temperature for 30 minutes to react the carbonyl compound with 2,4-DNPH. Subsequently, an aqueous solution of 1 M acetone (40  $\mu$ l) was added to the mixture. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 minutes to remove excess 2,4-DNPH by reacting it with acetone. The aqueous mixture was washed three times with 400  $\mu$ l of n-hexane. The aqueous layer was recovered and the absorbance thereof was measured at 360 nm in a spectrophotometric microplate reader (Nippon Molecular Devices Co.; SPECTRAMax250).

10 (ii) Preparation of calibration curve

Aqueous solutions of various glucose concentrations were prepared and the amounts of carbonyl compounds derived from glucose were measured by the same method as described in (i); a calibration curve of glucose concentration vs. concentration of carbonyl compound was prepared based on this experiment.

(iii) Quantification of carbonyl compounds

Respective glucose concentrations of the samples were determined by using a glucose assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Glucose CII-Test Wako). The amount of carbonyl compounds derived from glucose was estimated by using the calibration curve. The amount of carbonyl compound in the sample was determined by subtracting the amount of glucose-derived carbonyl compounds from the total amount of carbonyl compounds in the sample solution.

The result obtained is shown in Fig. 10. As the concentration of aminoguanidine increased, the amounts of carbonyl compounds other than glucose decreased, both in the unincubated and incubated (37°C for 15 hours) samples.

These results showed that the addition of the carbonyl compound-trapping agent to the peritoneal dialysate or the administration of the trapping agent to patients is effective in inhibiting the generation and/or accumulation of carbonyl compounds in the peritoneal dialysate infused into the peritoneal cavity. Thus, carbonyl compounds derived from the peritoneal dialysate or from the blood are eliminated from the peritoneal cavity, thereby achieving the improvement of the carbonyl-stress state in peritoneal-dialysis patients.

Example 5. Effect of a carbonyl compound-trapping agent added to the peritoneal dialysate in the process of heat sterilization

Peritoneal dialysates contain a high concentration of glucose as an osmoregulatory agent (1.35-4.0 w/v%). Glucose is unstable to heating and undergoes degradation during heat sterilization or storage. Degradation products of glucose have been reported to include 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), levulinic acid, and acetaldehyde (Richard; J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853(1984); Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993)). The inventors tested aminoguanidine for its inhibiting effect on the generation of carbonyl compounds during heat sterilization of a peritoneal dialysate, by monitoring the quantities of 5-HMF and carbonyl compounds. Since the degree of glucose degradation is affected by pH of the solution, two peritoneal dialysates of acidic pH (pH 5.3) and neutral pH (pH 7.0) were prepared to carry out the experiment. Sterilization temperature was 121°C.

<5-1>

5-HMF was assayed by high performance liquid chromatography (SHIMADZU Co.; LC-10A) (Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993)).

The results showed that aminoguanidine effectively inhibited the generation of 5-HMF in a concentration-dependent manner at both acidic pH (Fig. 11) and neutral pH (Fig. 12).

<5-2>

Quantification of carbonyl compounds in the peritoneal dialysate was carried out in the same manner as described in Example 1 by measuring the absorbance after the reaction with 2,4-DNPH (Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233: 346-357 (1994)). Sterilization temperature was 121°C.

The result showed that aminoguanidine also effectively inhibited the generation of carbonyl compounds in a concentration-dependent manner (Fig. 13).

These findings clarified that the addition of an agent inhibiting the generation of carbonyl compounds to the peritoneal dialysate is highly effective in inhibiting the generation and/or accumulation

of carbonyl compounds in the peritoneal dialysate.

Example 6. Effect of carbonyl compound-trapping beads added to the peritoneal dialysate on the generation of pentosidine

5 Carbonyl compound-trapping beads, which comprise sulfonylhydrazine group-bound crosslinked polystyrene resin (PS-TsNHNH<sub>2</sub>; ARGONAUT TECHNOLOGIES CO.), were tested for the effect of eliminating carbonyl compounds from the peritoneal dialysate. The peritoneal dialysate, and the dialysate containing carbonyl  
10 compound-trapping beads, were incubated at 37°C to evaluate the effect of inhibiting the generation of pentosidine. Dimethylsulfoxide (100 µl) was added to the tube containing carbonyl compound-trapping beads, to swell the beads. Then 800 µl of a peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; Dianeal PD-4,1.5) and 200 µl of an aqueous solution of 150 mg/ml  
15 bovine serum albumin were added to the tube. The tube was incubated at 37°C for 1 week. After the incubation, the beads were removed by using a centrifugal filter tube (Millipore Co.; UFC30GV00) having membrane pores of 0.22 µm. Next, 50 µl of 10% trichloroacetic acid was added to the solution (50 µl) from which the beads had been removed.  
20 The mixture was centrifuged to precipitate protein. The protein pellet was washed with 300 µl of 5% trichloroacetic acid, and then dried. Then, 100 µl of 6 N HCl was added to the protein pellet, and the dissolved protein was heated at 110°C for 16 hours. The resulting sample was assayed for the quantification of pentosidine by HPLC (T. Miyata et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206; T. Miyata et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358).  
25

The amounts of pentosidine generated by the incubation at 37°C are summarized in Fig. 14. It was revealed that the addition of carbonyl compound-trapping beads had a strong effect in inhibiting the  
30 generation of pentosidine.

Example 7. Effect of the elimination of carbonyl compounds by carbonyl compound-trapping beads added to the peritoneal dialysate

35 Carbonyl compound-trapping beads were tested for the effect of eliminating carbonyl compounds from the peritoneal dialysate. Dimethylsulfoxide (100 µl) was added to a tube containing carbonyl

compound-trapping beads (PS-TsNHNH<sub>2</sub>; ARGONAUT TECHNOLOGIES CO.), to swell the beads. Then, 900 µl of a peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; Dianeal PD-4,1.5) was added. The mixture was stirred at room temperature for 16 hours by using a rotator. Subsequently, the suspension containing the carbonyl compound-trapping beads was filtered with a centrifugal filter tube (Millipore Co.; UFC30GV00), having membrane pores of 0.22 µm, and the amount of carbonyl compounds in the filtrate was assayed by following method.

#### <Quantification of carbonyl compounds>

##### 10 (1) Assay of sample solutions

A sample solution (200 µl) was mixed with 200 µl of a 0.5 N hydrochloric acid solution containing 2,4-DNPH (0.025%), and the mixture was incubated at 30°C for 30 minutes. Subsequently, an aqueous solution of 1 M acetone (20 µl) was added to the mixture. The resulting mixture was incubated at 30°C for 10 minutes. The aqueous mixture was washed 3 times with 200 µl of n-hexane, and 200 µl of octanol was added to the aqueous layer to extract the hydrazone. The octanol layer was recovered and the absorbance thereof was measured at 360 nm in a spectrophotometric microplate reader (Nippon Molecular Devices Co.; SPECTRAMax250).

##### (2) Preparation of calibration curve

Aqueous solutions of various glucose concentrations were prepared and the amounts of carbonyl compounds derived from glucose were assayed by the same method as described in (i); a calibration curve of glucose concentration vs. concentration of carbonyl compounds was prepared based on this experiment.

##### (3) Quantification of carbonyl compounds

Glucose concentrations in sample solutions were measured using a glucose assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Glucose CII-Test Wako). The amount of carbonyl compounds derived from glucose was estimated by using the calibration curve. The amount of carbonyl compounds in the sample solution was determined by subtracting the amount of glucose-derived carbonyl compounds from the total amount of carbonyl compounds in the sample solution.

35 The results are shown in Fig. 15. The carbonyl compound-trapping beads (2 mg) were added to the peritoneal dialysate, and the suspension



was stirred at room temperature for 16 hours. This treatment reduced the amount of carbonyl compounds by 55%. When 10 mg of carbonyl compound-trapping beads were added to the dialysate, the amount of carbonyl compounds was further reduced.

5        These findings clarified that the carrier with immobilized carbonyl compound-trapping agent can be used for inhibiting the generation and/or accumulation of carbonyl compounds in the peritoneal dialysate.

10    Example 8. The activity of activated charcoal in trapping carbonyl compounds in a dicarbonyl compound solution

Activated charcoal was used as a carbonyl compound-trapping agent to evaluate its effect of eliminating carbonyl compounds from a dicarbonyl compound solution. A dicarbonyl compound solution was  
15    prepared by dissolving a dicarbonyl compound (100  $\mu$ M) in a phosphate buffer (abbreviated hereafter "PBS"). The solution (900  $\mu$ l) was added to a tube containing 25  $\mu$ g or 50  $\mu$ g of activated charcoal (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Dicarbonyl compounds used were glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone. The tube was placed on a rotator  
20    and stirred at room temperature for 19 hours. After stirring, the solution in the tube was filtered by a centrifugal filter tube (Millipore Co.; UFC30GV00) having membrane pores of 0.22  $\mu$ m. The concentration of each dicarbonyl compound was determined by high performance liquid chromatography according to a commonly used method.

25    The results are shown in Fig. 16. When 25  $\mu$ g of activated charcoal was added to 900  $\mu$ l of the dicarbonyl compound solution, the activated charcoal trapped glyoxal (GO) by 71%, methylglyoxal (MGO) by 94%, and 3-deoxyglucosone (3DG) by 93%. When 50  $\mu$ g of activated charcoal was used, the charcoal trapped glyoxal by 85%, and both methylglyoxal  
30    and 3-deoxyglucosone by 98%. Thus, it was confirmed that most of each dicarbonyl compound tested was trapped by activated charcoal.

Example 9. The activity of activated charcoal in trapping carbonyl compound in the peritoneal dialysate

35    Activated charcoal was used as a carbonyl compound-trapping agent to evaluate its effect of eliminating carbonyl compounds from the

peritoneal dialysate. An aliquot (900  $\mu$ l) of peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; Dianeal PD-4, 1.5) was added to a tube containing 25  $\mu$ g or 50  $\mu$ g of activated charcoal (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). The tube was placed on a rotator and stirred at room temperature for 19 hours. After stirring, the solution in the tube was filtered by a centrifugal filter tube (Millipore Co.; UFC30GV00) having membrane pores of 0.22  $\mu$ m. The concentrations of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone were determined by high performance liquid chromatography according to a commonly used method.

The results are shown in Fig. 17. When 25  $\mu$ g of activated charcoal was added to 900  $\mu$ l of the peritoneal dialysate, the activated charcoal trapped glyoxal (GO) by 56%, methylglyoxal (MGO) by 71%, and 3-deoxyglucosone (3DG) by 62%, as compared with the dialysates without activated charcoal. When 50  $\mu$ g of activated charcoal was used, the charcoal trapped glyoxal by 64%, methylglyoxal by 78%, and 3-deoxyglucosone by 77%. Thus, it was confirmed that each dicarbonyl compound tested was trapped by activated charcoal.

Example 10. The activities of guanidine, aminoguanidine, and biguanide agents in trapping glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone

A mixture (50  $\mu$ l) of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone (1 mM each) was further mixed with 400  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), and each (50  $\mu$ l; 30 mM) of guanidine, aminoguanidine, or a biguanide agent. The resulting mixture was incubated at 37°C. Biguanide agents used were metformin, buformin, and phenformin. After the incubation, glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone were converted to quinoxaline derivatives by using o-phenylenediamine, and then the respective concentrations were determined by high performance liquid chromatography.

The results are shown in Fig. 18 (guanidine), Fig. 19 (metformin), Fig. 20 (buformin), Fig. 21 (phenformin), and Fig. 22 (aminoguanidine). Guanidine, aminoguanidine, and all the biguanide agents were shown to have the effect of markedly reducing the concentration of methylglyoxal, in particular. Further, aminoguanidine drastically reduced the concentration of methylglyoxal, and in addition, it has

the effect of markedly reducing the concentration of 3-deoxyglucosone, which was not significantly reduced by other biguanides.

Example 11. The activity of SH agent in trapping glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone

A solution (50  $\mu$ l) of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone (1 mM each) was further mixed with 400  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and an SH compound solution (50  $\mu$ l; 30 mM). The resulting mixture was incubated at 37°C. SH compounds used were cysteine, N-acetylcysteine, and GSH. After the incubation, glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone were converted to quinoxaline derivatives by using o-phenylenediamine, and then the respective concentrations were determined by high performance liquid chromatography.

The results are shown in Fig. 23 (cysteine), Fig. 24 (N-acetylcysteine), and Fig. 25 (GSH). All the SH compounds were found to have the effect of markedly reducing the concentrations of both glyoxal and methylglyoxal.

Example 12. The activity of albumin in trapping glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone

A solution (50  $\mu$ l) consisting of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone (1 mM each) was further mixed with 400  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 50  $\mu$ l of 100 mg/ml bovine serum albumin solution, and the resulting mixture was incubated at 37°C. After the incubation, glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone were converted to quinoxaline derivatives by using o-phenylenediamine, and then the respective concentrations were determined by high performance liquid chromatography.

The results are shown in Fig. 26. Bovine serum albumin was found to have the effect of markedly reducing the concentrations of glyoxal and methylglyoxal.

Example 13. Effect of SH compounds added to the peritoneal dialysate and incubated at 37°C on inhibition of the generation of pentosidine

An aliquot (490  $\mu$ l) of a peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; PD-4,

1.5) was mixed with 70  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing an SH compound and 140  $\mu$ l of the peritoneal dialysate (Baxter Ltd.; PD-4, 1.5) containing 30 mg/ml bovine serum albumin. The resulting mixture was incubated at 37°C for 1 week. SH compounds used were  
 5 cysteine, N-acetylcysteine, and GSH. Aminoguanidine was also used. After the incubation, 50  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid was added to the solution (50  $\mu$ l). The mixture was centrifuged to precipitate the protein. The protein pellet was washed with 300  $\mu$ l of 5% trichloroacetic acid, and then dried. Then, 100  $\mu$ l of 6 N HCl was  
 10 added to the protein pellet, and the dissolved protein was heated at 110°C for 16 hours. The resulting sample was assayed for the quantification of pentosidine by high performance liquid chromatography (T. Miyata et al., 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7:1198-1206; T. Miyata et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,  
 15 93:2353-2358).

The results are shown in Fig. 27. It was revealed that the addition of SH compounds had a marked effect of inhibiting the generation of pentosidine.

## 20 Industrial Applicability

The present invention can readily eliminate toxic damages caused by carbonyl compounds during peritoneal dialysis, which had been tormenting patients for a long time. When conventional peritoneal dialysates were used, the peritoneum of a patient being dialyzed was  
 25 constantly under the carbonyl-stress state caused by carbonyl compounds transferred to the peritoneal cavity from other parts of the body during dialysis, as well as by the carbonyl compounds generated in the process of manufacturing the dialysates. In contrast, the present invention can effectively eliminate carbonyl compounds  
 30 generated in peritoneal dialysates, and therefore, can sufficiently contribute to the improvement of carbonyl stress of dialysis patients. Furthermore, carbonyl compounds transferred to the peritoneal cavity can also be inactivated or eliminated effectively by infusing a carbonyl compound-trapping agent or by circulating a dialysate through a  
 35 carbonyl compound-trapping cartridge. Thus, the present invention provides a quite effective approach to prevent damages caused by

peritoneal dialysis including peritoneal damages caused by carbonyl compounds associated with peritoneal dialysis.

In addition, the present invention enables removing carbonyl compounds generated by the degradation of glucose during heat sterilization and long-term storage, thereby successfully providing a peritoneal dialysate of neutral pH, which has previously been pharmaceutically difficult to prepare because of the degradation of glucose. Thus, the present invention enables a more physiological peritoneal dialysis treatment.

The inventive peritoneal dialysate can be practically used with only a simple procedure such as contacting with the carbonyl compound-trapping agent or administering directly. Furthermore, the production of inventive peritoneal dialysate does not require any specific facilities. Thus, the carbonyl compound-trapping agent based on the present invention, the peritoneal dialysate using the same, and the method of production thereof, creates a new therapeutic concept for peritoneal dialysis treatment.

## CLAIMS

1. An agent for improving intraperitoneal carbonyl-stress state during peritoneal dialysis, comprising a carbonyl compound-trapping agent  
5 as an active ingredient.
2. The agent of claim 1, wherein the carbonyl compound-trapping agent is immobilized on an insoluble carrier.
3. The agent of claim 1, wherein the carbonyl compound-trapping agent is to be mixed with a peritoneal dialysate.
- 10 4. The agent of any one of claims 1 to 3, wherein the carbonyl compound-trapping agent is selected from the group consisting of aminoguanidine, pyridoxamine, hydrazine, biguanide compound, SH group containing compound, and derivatives of these.
5. The agent of any one of claims 1 to 3, wherein the carbonyl  
15 compound-trapping agent is an agent inhibiting Maillard reaction.
6. The agent of claim 1, wherein the carbonyl compound-trapping agent is a compound insoluble in peritoneal dialysates and capable of adsorbing carbonyl compounds.
7. A cartridge used for trapping carbonyl compounds within peritoneal  
20 dialysates, wherein the cartridge is filled with the carbonyl compound-trapping agent(s) of claim 2 and/or claim 6.
8. A method for preparing a peritoneal dialysate having a reduced carbonyl compound content, the method comprising passing the peritoneal dialysate through the cartridge of claim 7.
- 25 9. A method for preparing a peritoneal dialysate having a reduced carbonyl compound content, the method comprising:  
(a) contacting the peritoneal dialysate with the carbonyl compound-trapping agent(s) of claim 2 and/or claim 6, and  
(b) separating the peritoneal dialysate from the carbonyl  
30 compound-trapping agent.
10. A peritoneal dialysate comprising a carbonyl compound-trapping agent.
11. The peritoneal dialysate of claim 10, wherein the peritoneal dialysate further comprises a reducing sugar, and is placed in a  
35 container comprising a first compartment and a second compartment so that the first compartment contains the reducing sugar and the

second compartment contains the carbonyl compound-trapping agent.  
12. The peritoneal dialysate of claim 10, wherein the carbonyl compound-trapping agent is to be administered into the intraperitoneal cavity.

## ABSTRACT

Carbonyl compounds generated and accumulated in the peritoneal dialysate can be inactivated or eliminated by a carbonyl compound-trapping agent such as aminoguanidine. Carbonyl compounds generated during sterilization and storage of the peritoneal dialysate can be eliminated by pre-contacting with the trapping agent. Further, it is possible to eliminate carbonyl compounds transferred from the blood to the peritoneal cavity of the patient during peritoneal dialysis treatment, by adding the trapping agent to the peritoneal dialysate or by circulating the fluid through a carbonyl compound-trapping cartridge. Intraperitoneal protein modification by carbonyl compounds is inhibited by the present invention, thereby sufficiently reducing peritoneal disorders associated with peritoneal dialysis treatment.



Figure 1

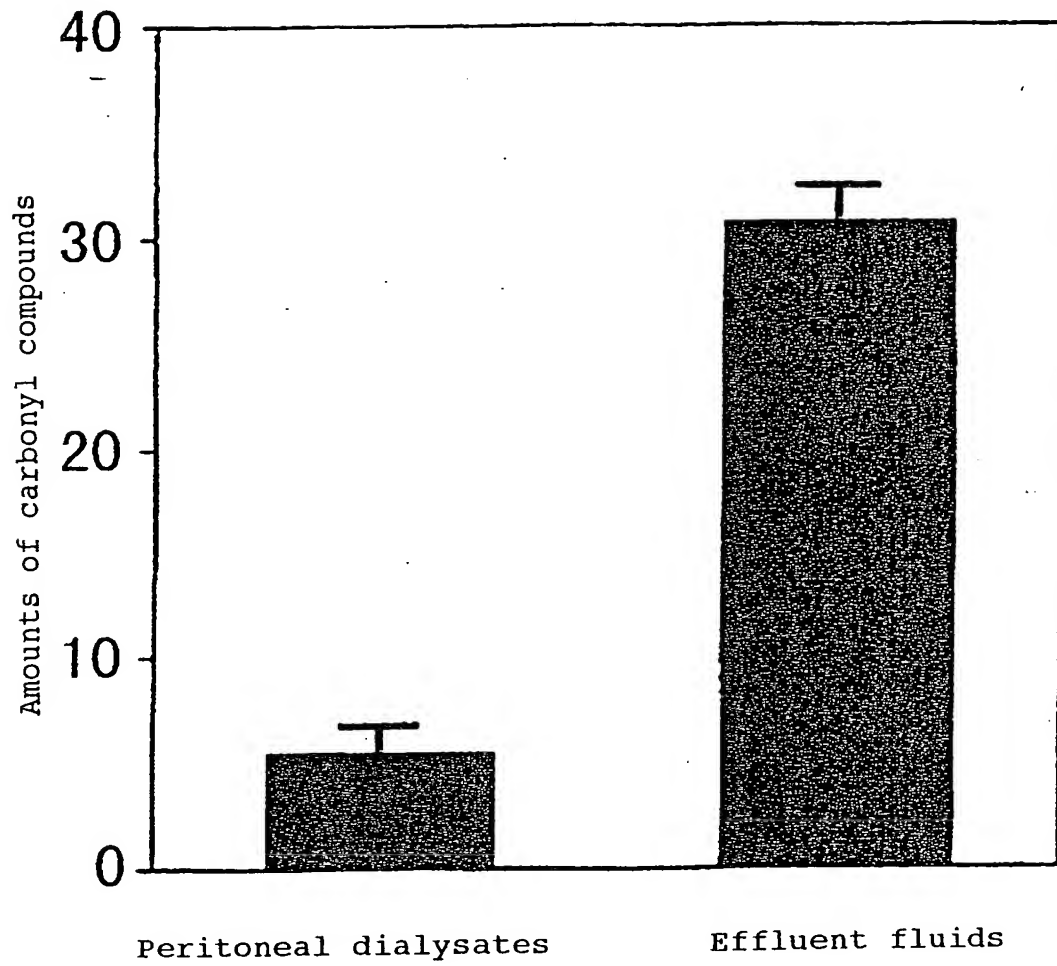


Figure 2

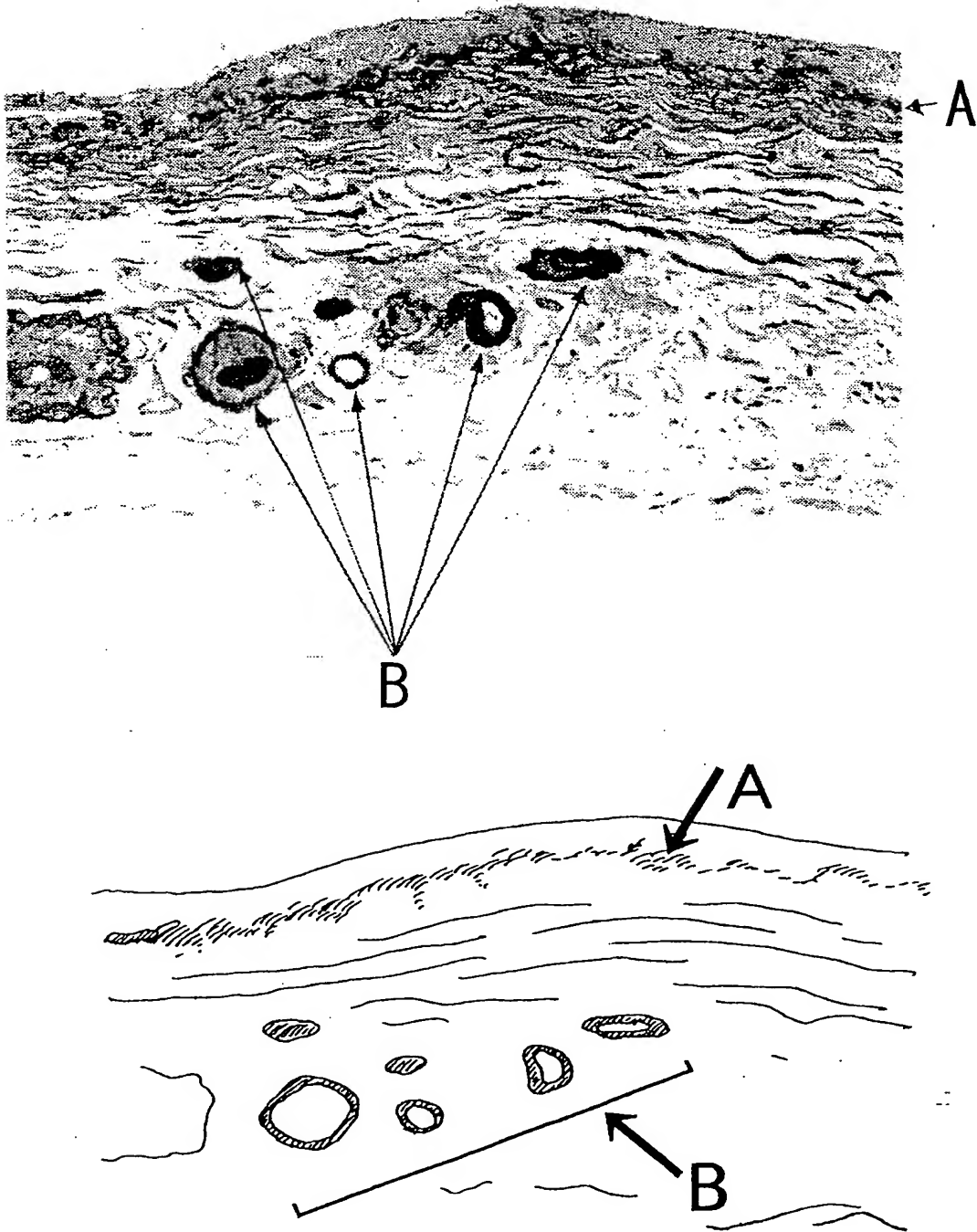


Figure 3

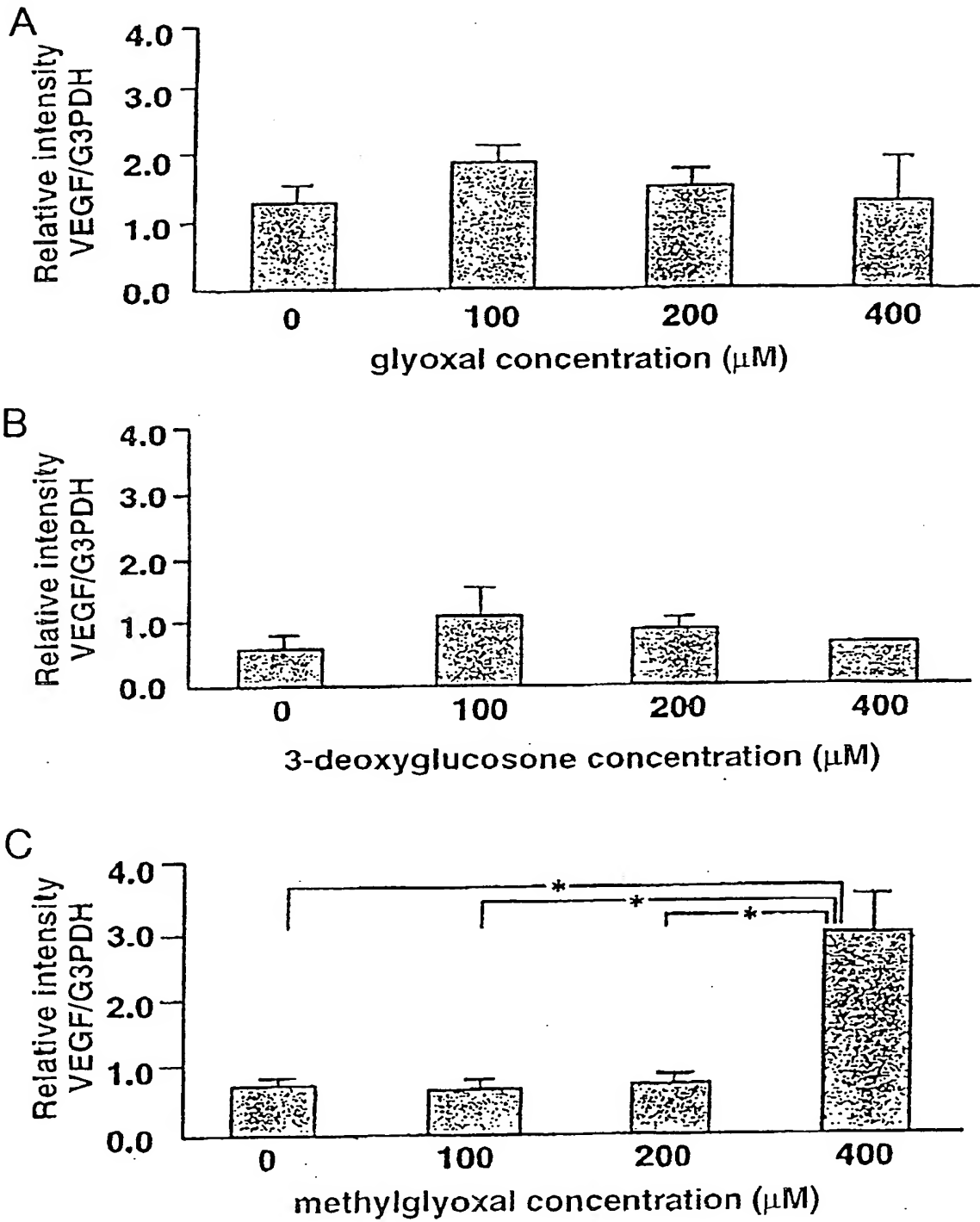


Figure 4

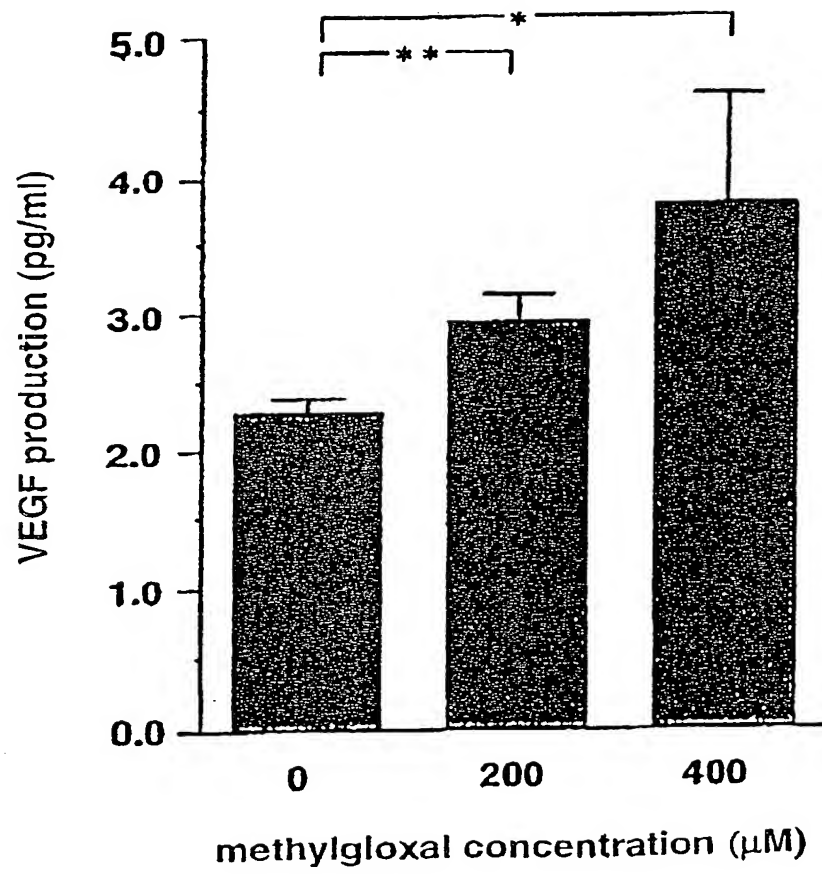


Figure 5

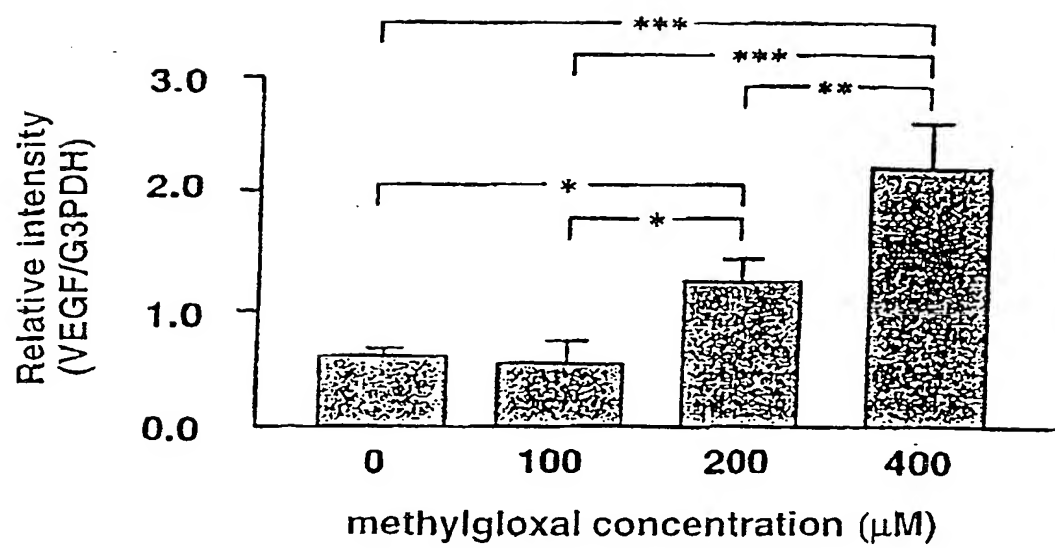


Figure 6

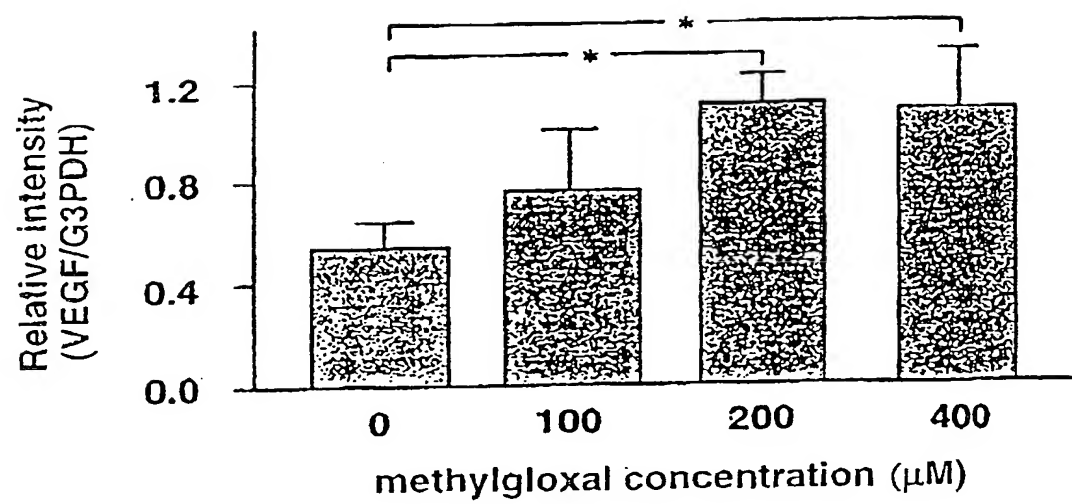


Figure 7

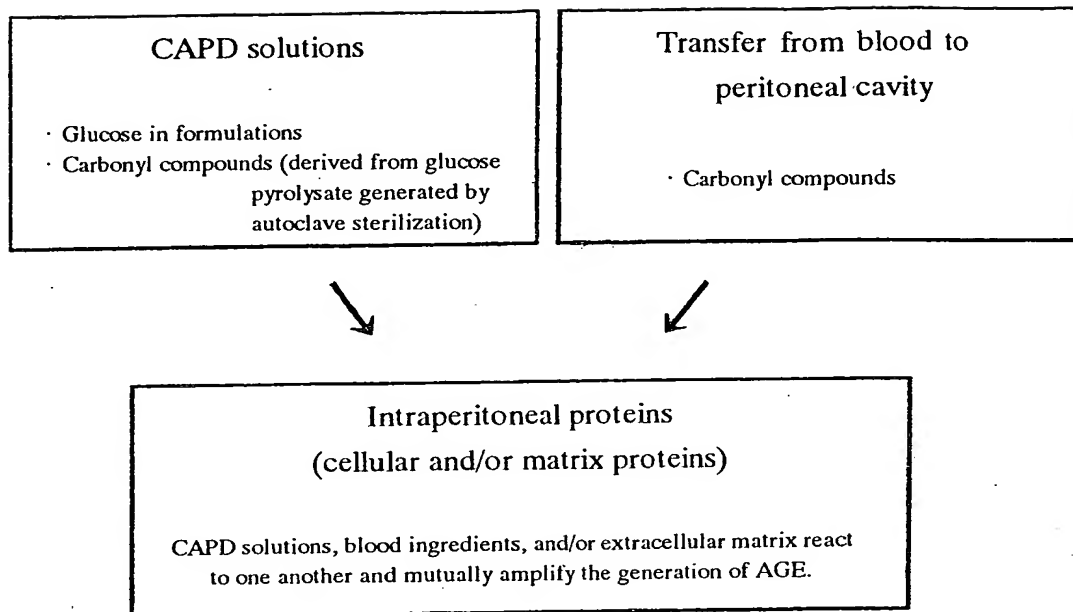


Figure 8

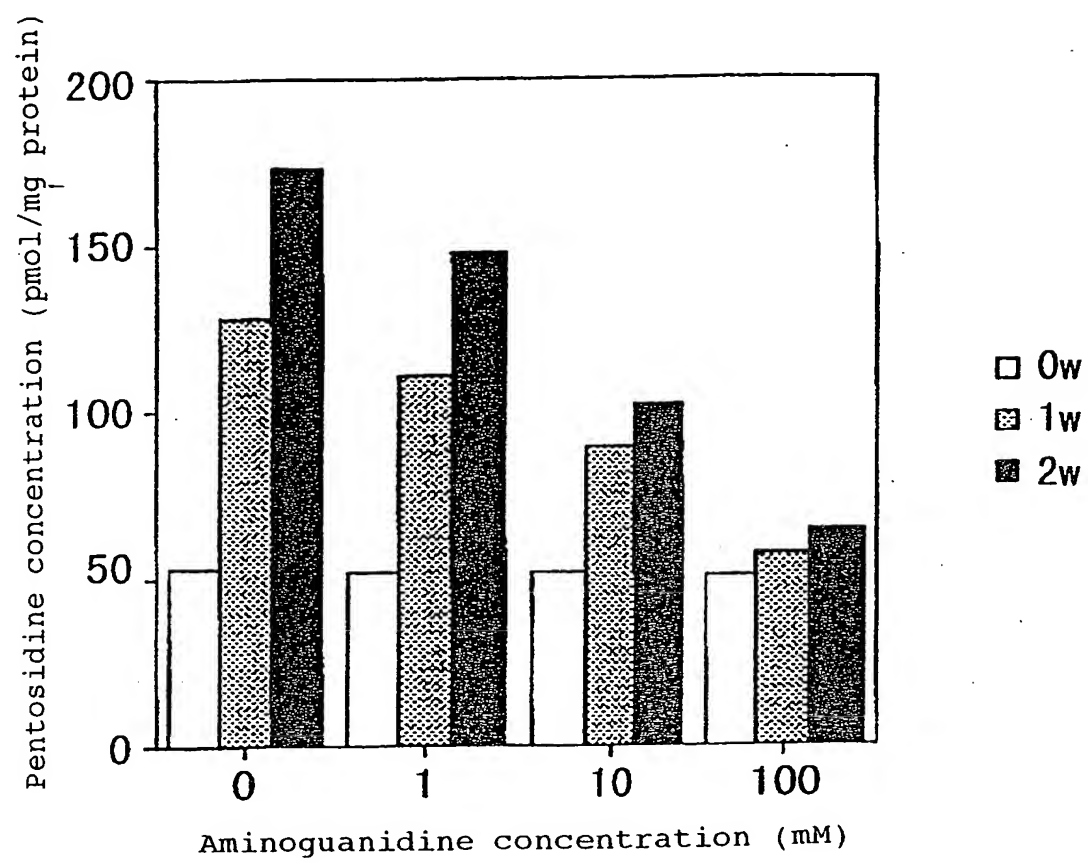




Figure 9

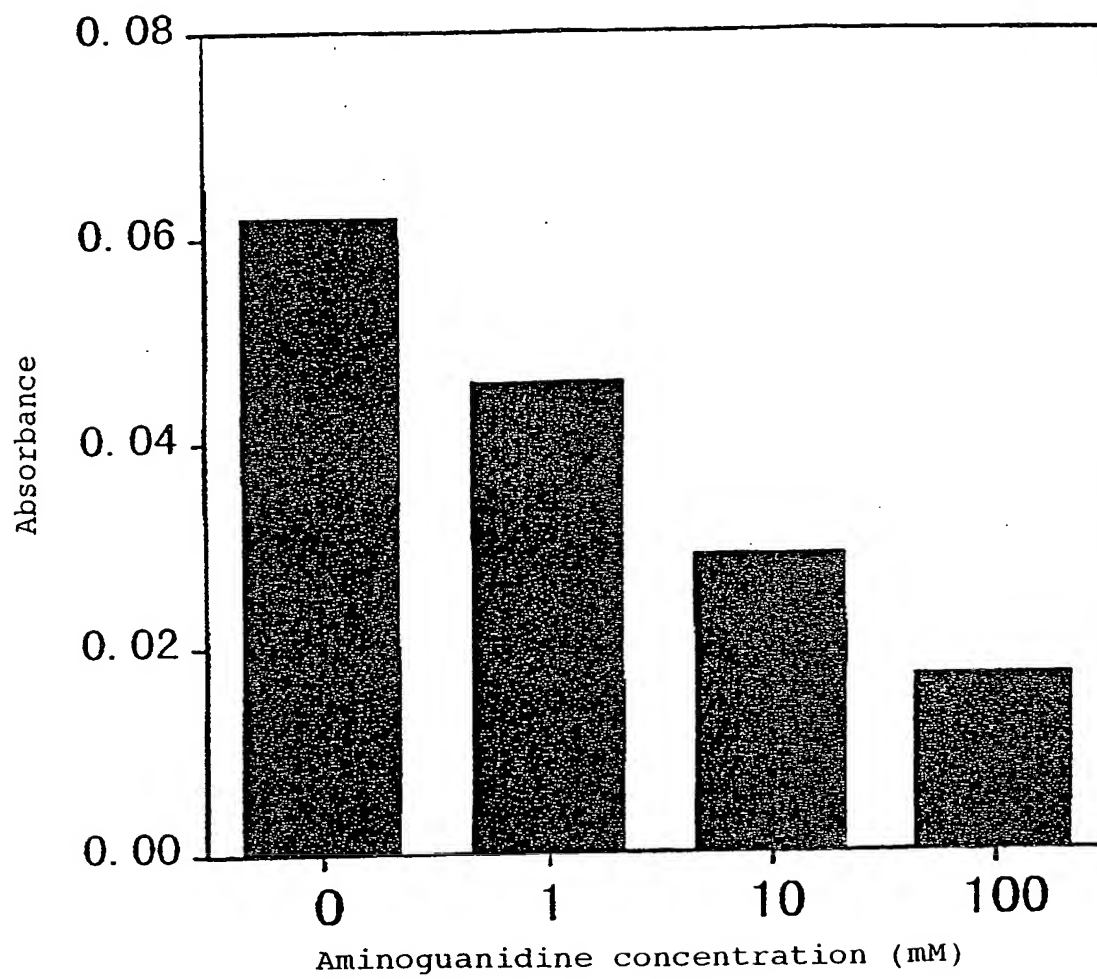


Figure 10

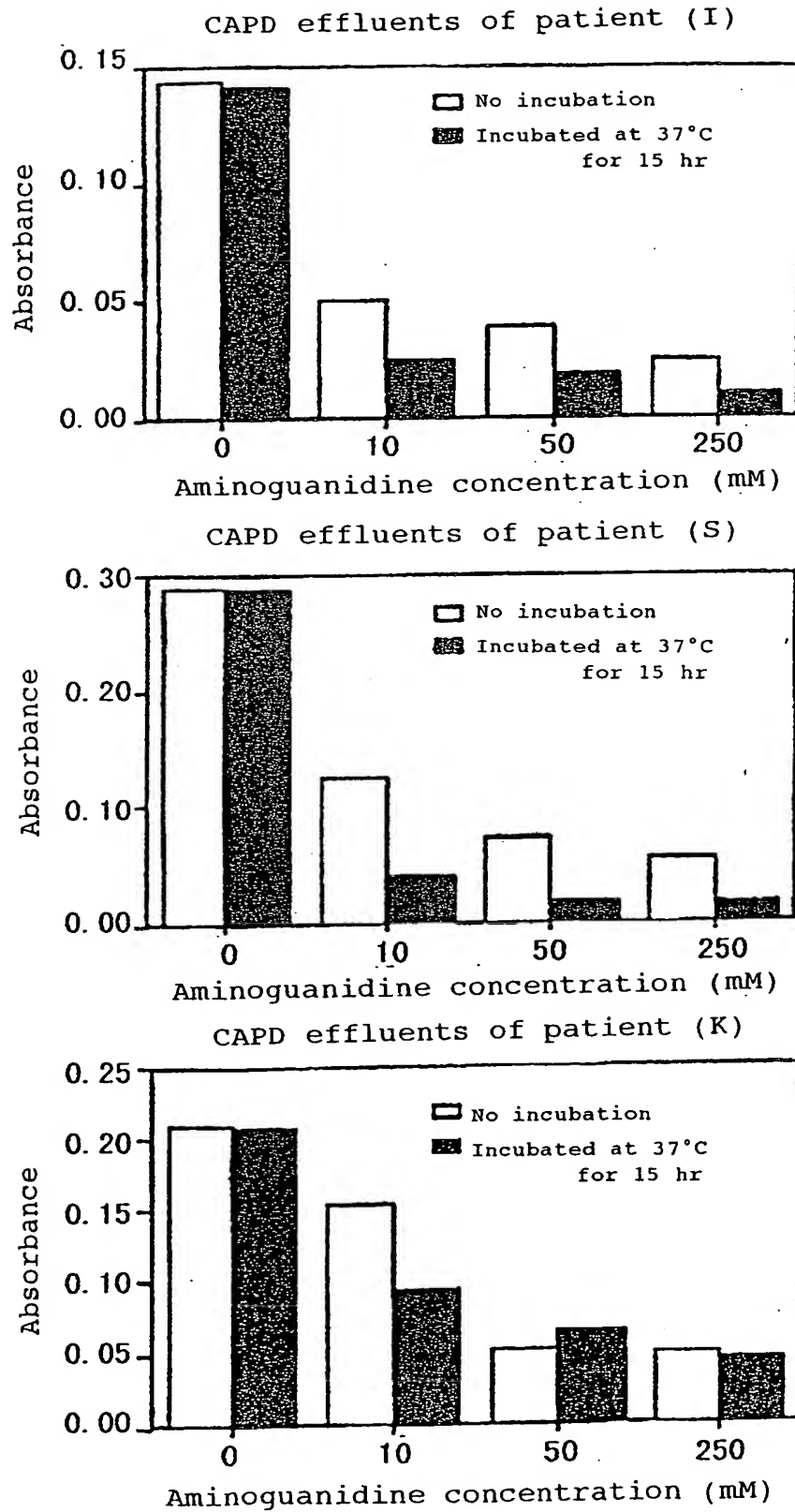


Figure. 11

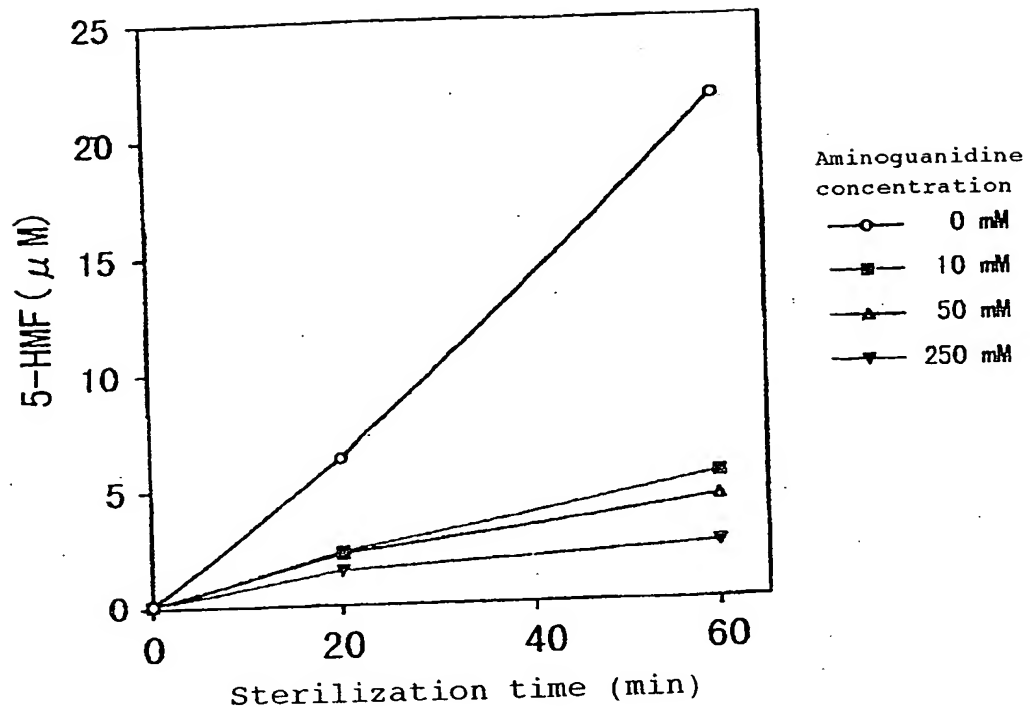


Figure 12

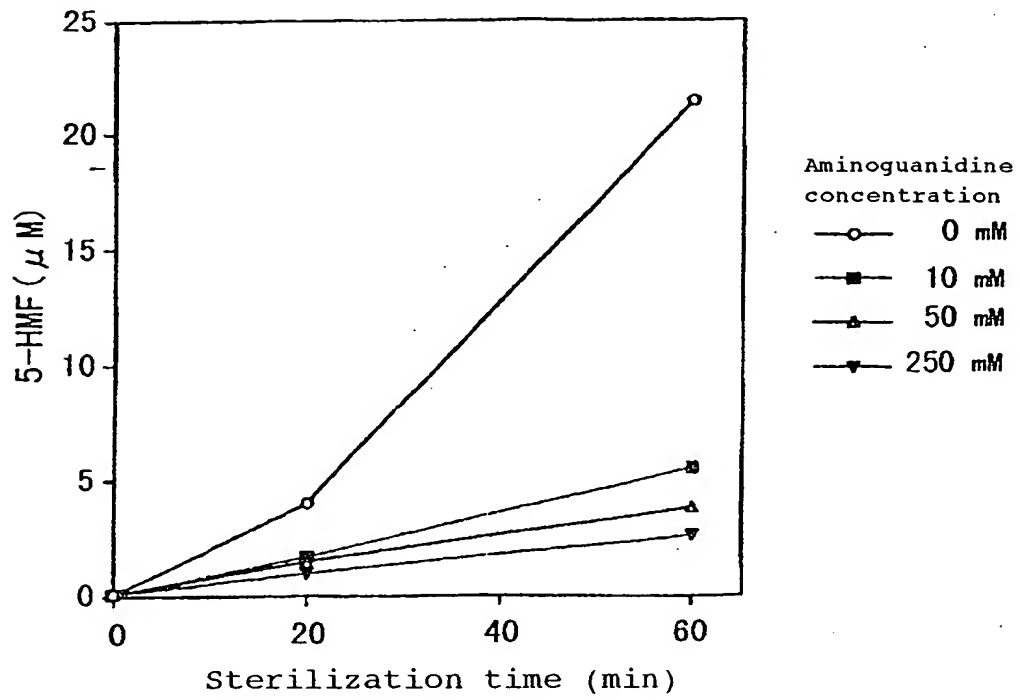


Figure 13

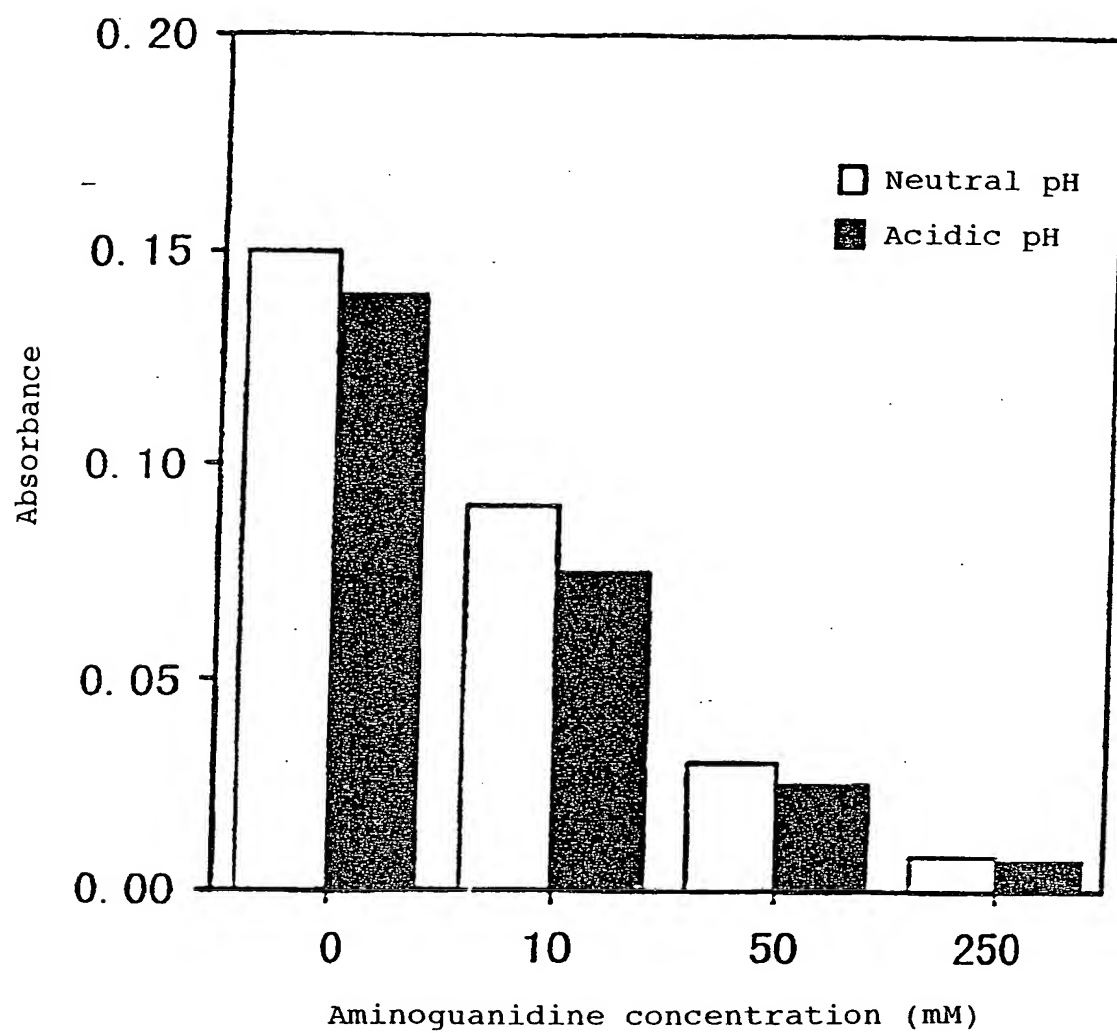


Figure 14

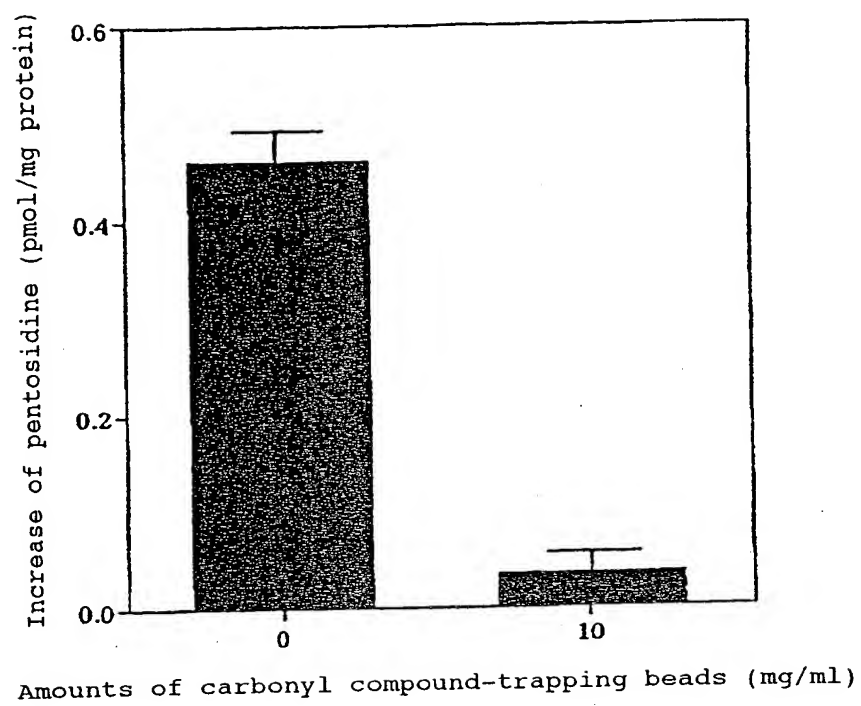


Figure 15

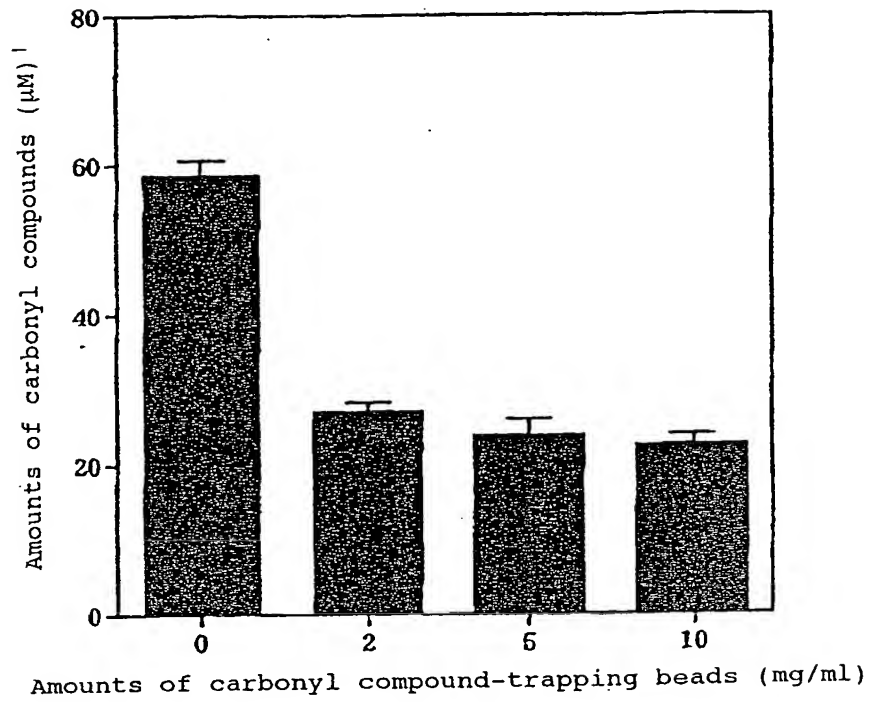


Figure 16

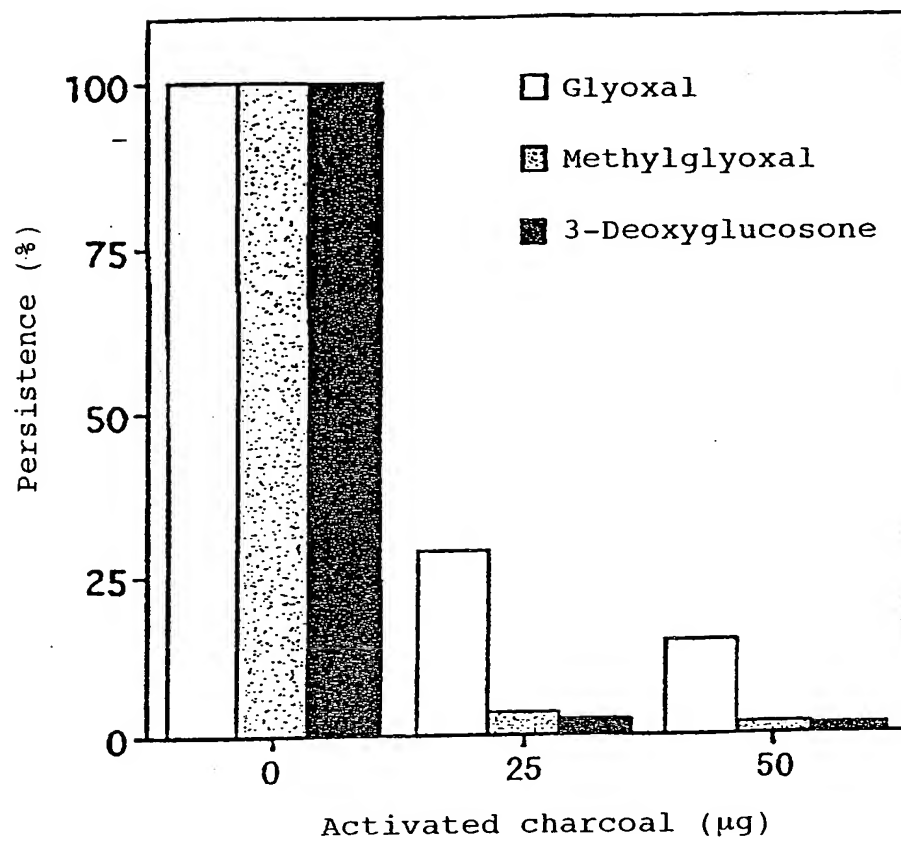




Figure 17

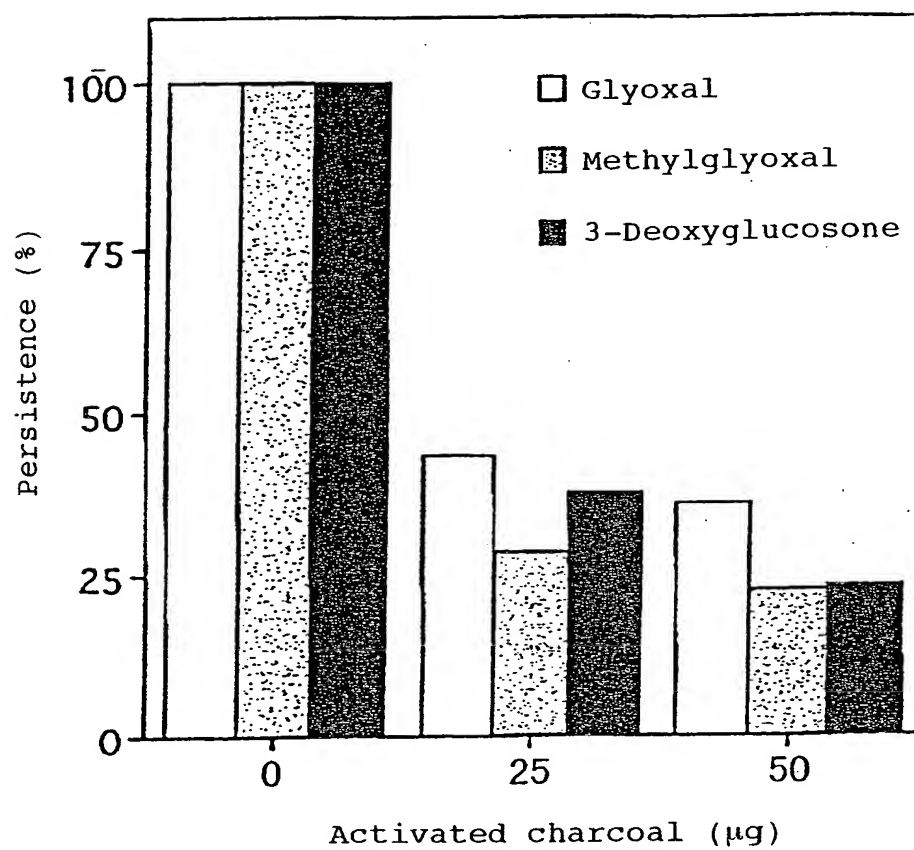


Figure 18

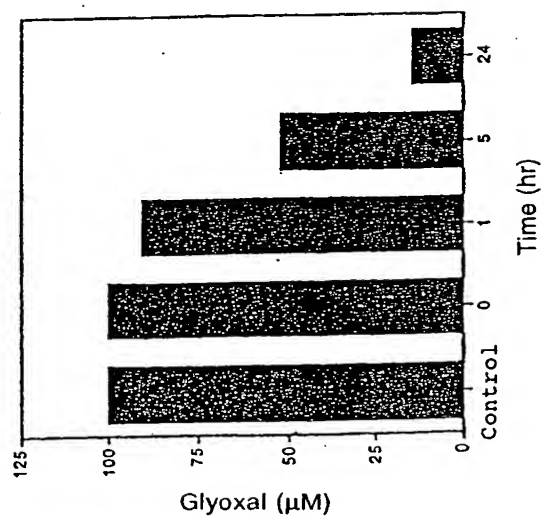
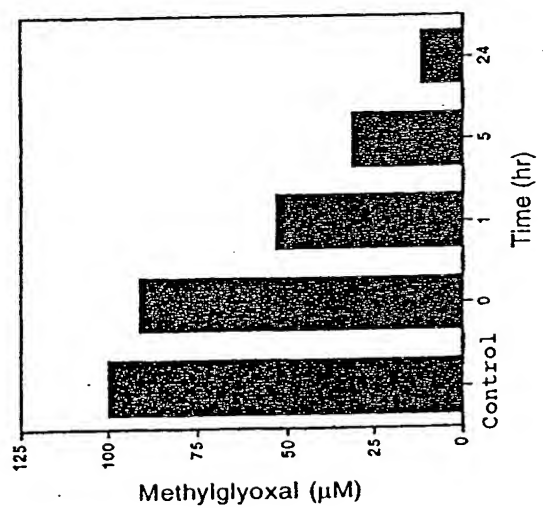
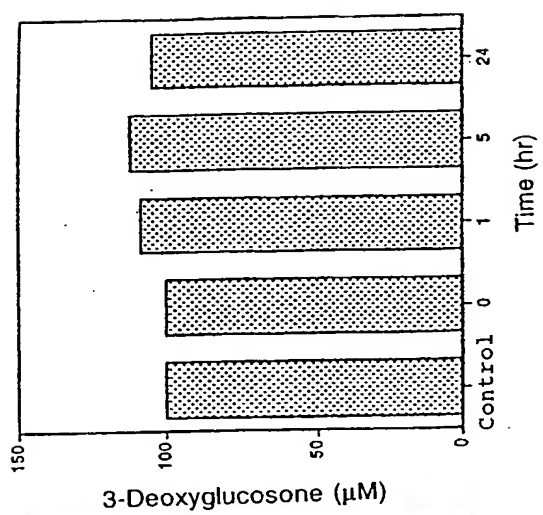


Figure 19

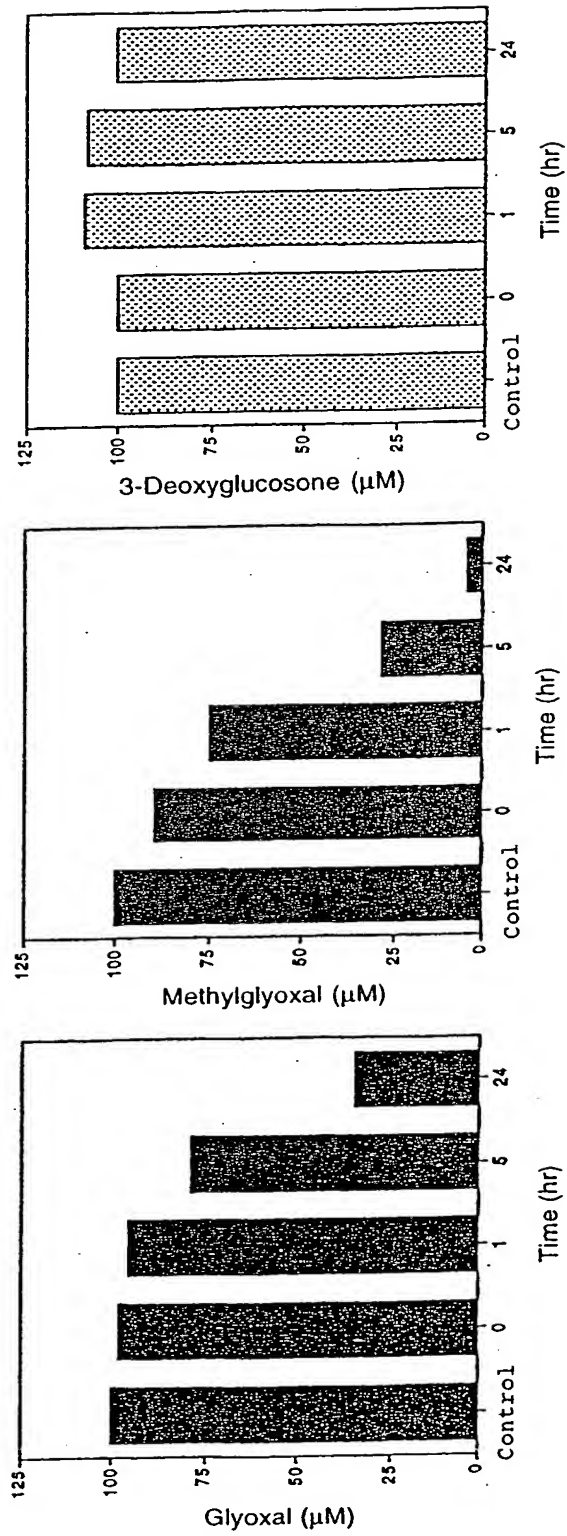


Figure 20

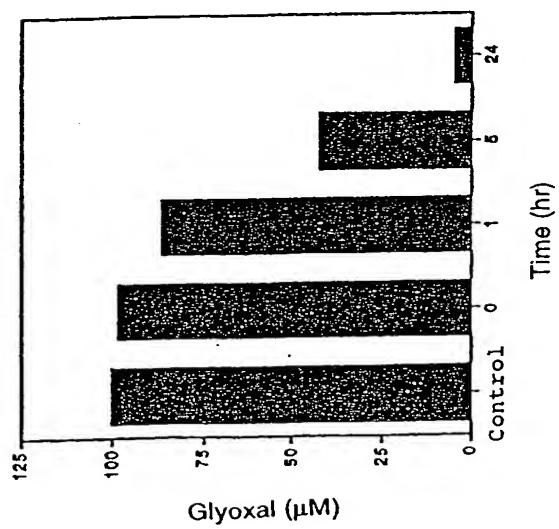
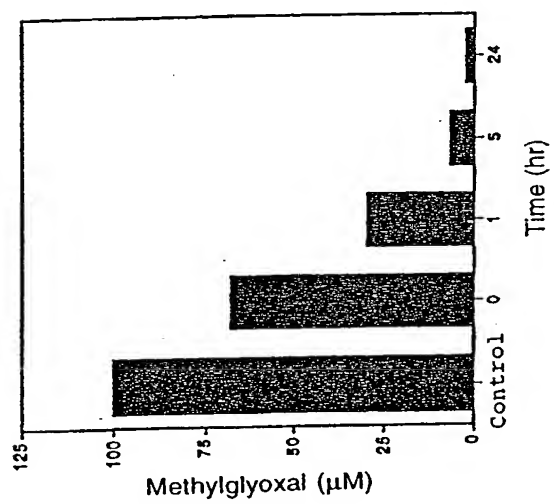
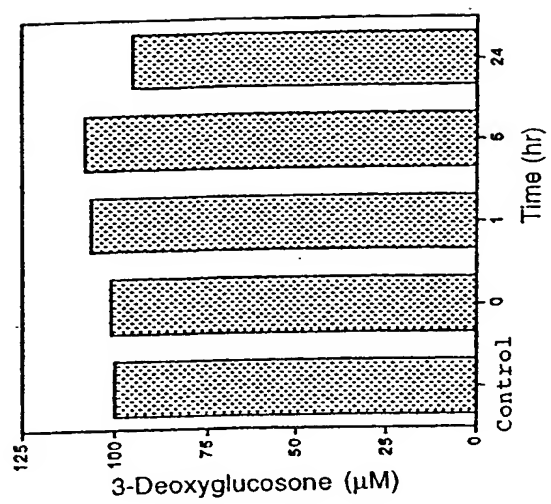


Figure 21

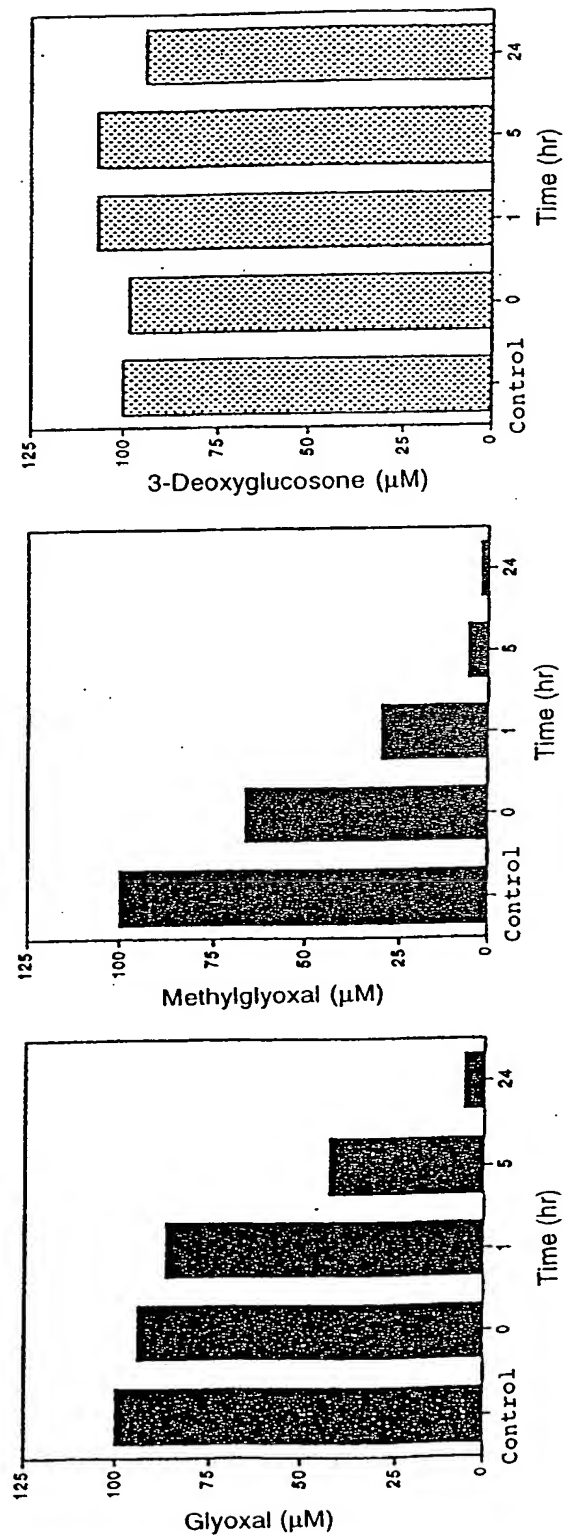


Figure 22

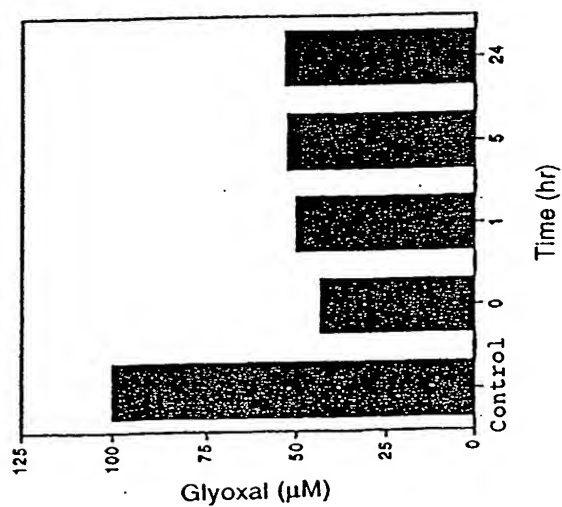
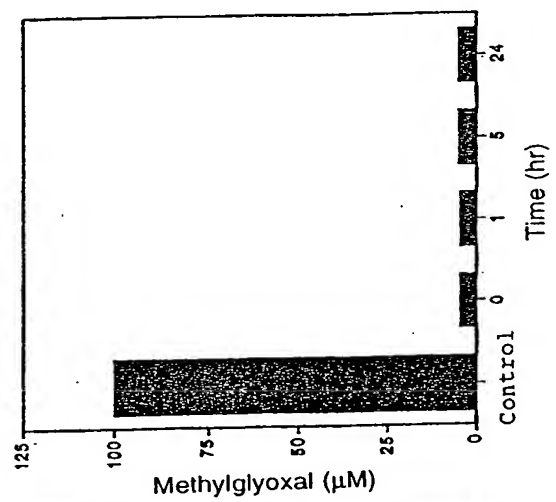
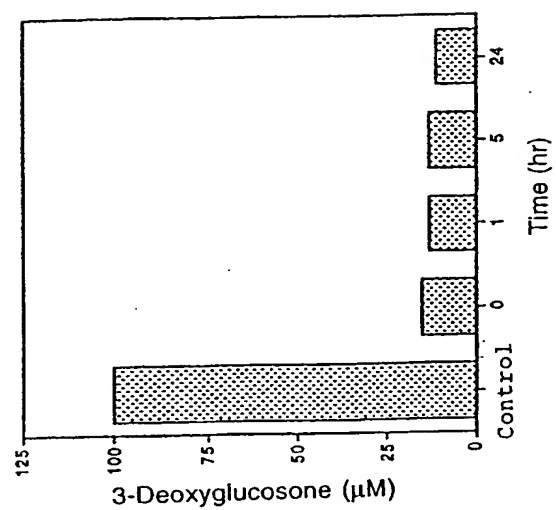


Figure 23

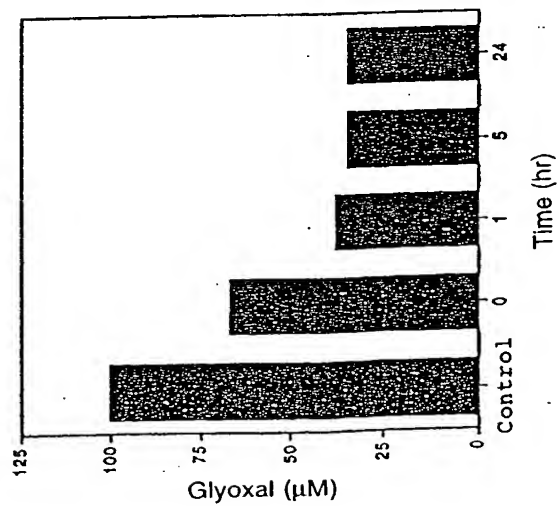
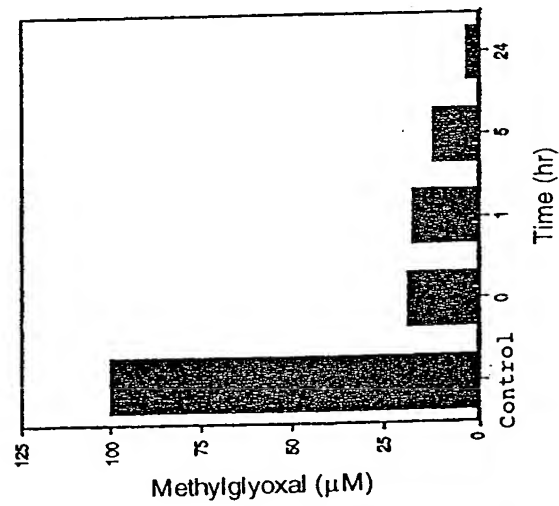
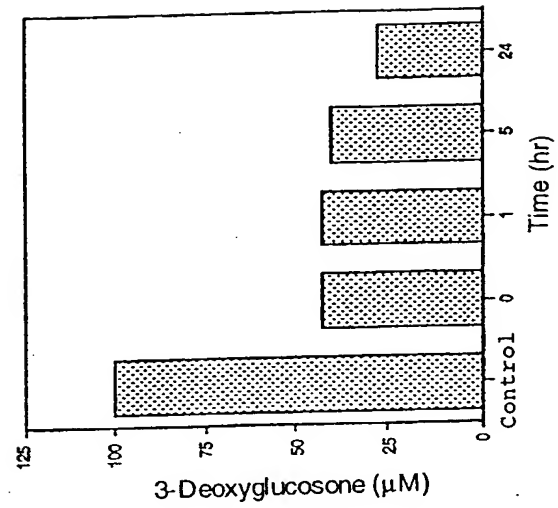


Figure 24

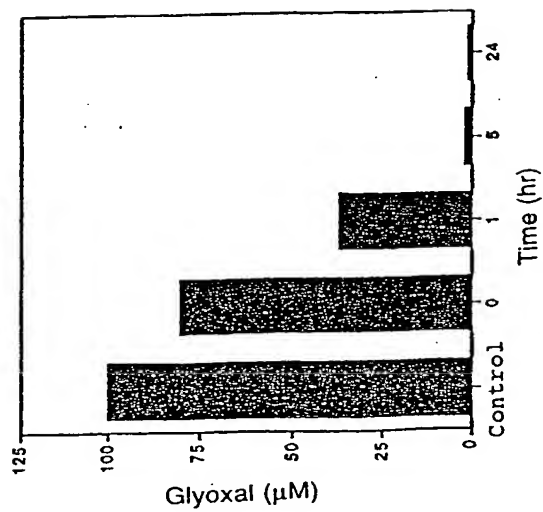
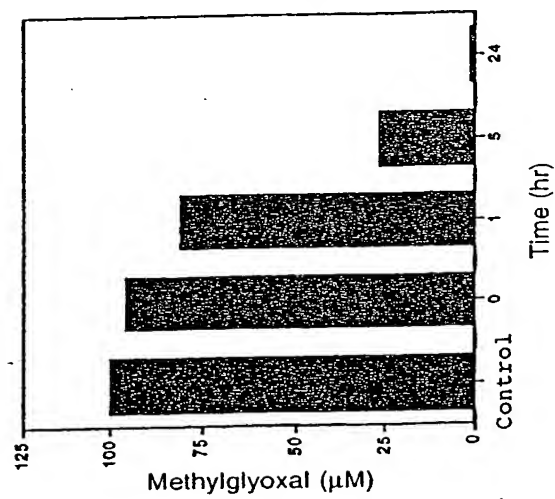
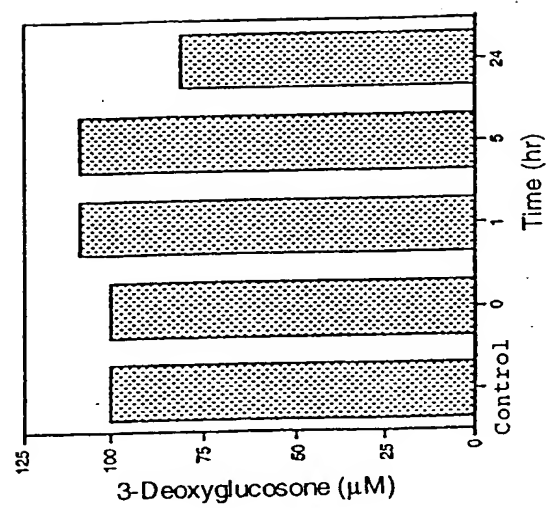




Figure 25

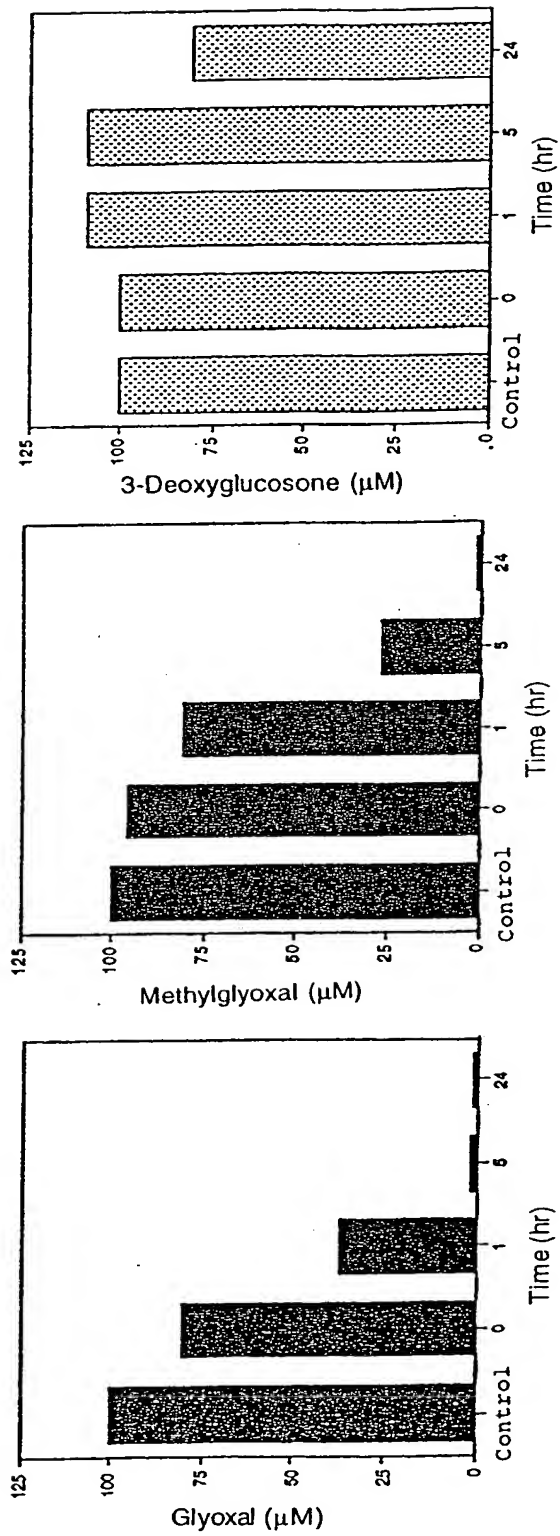


Figure 26

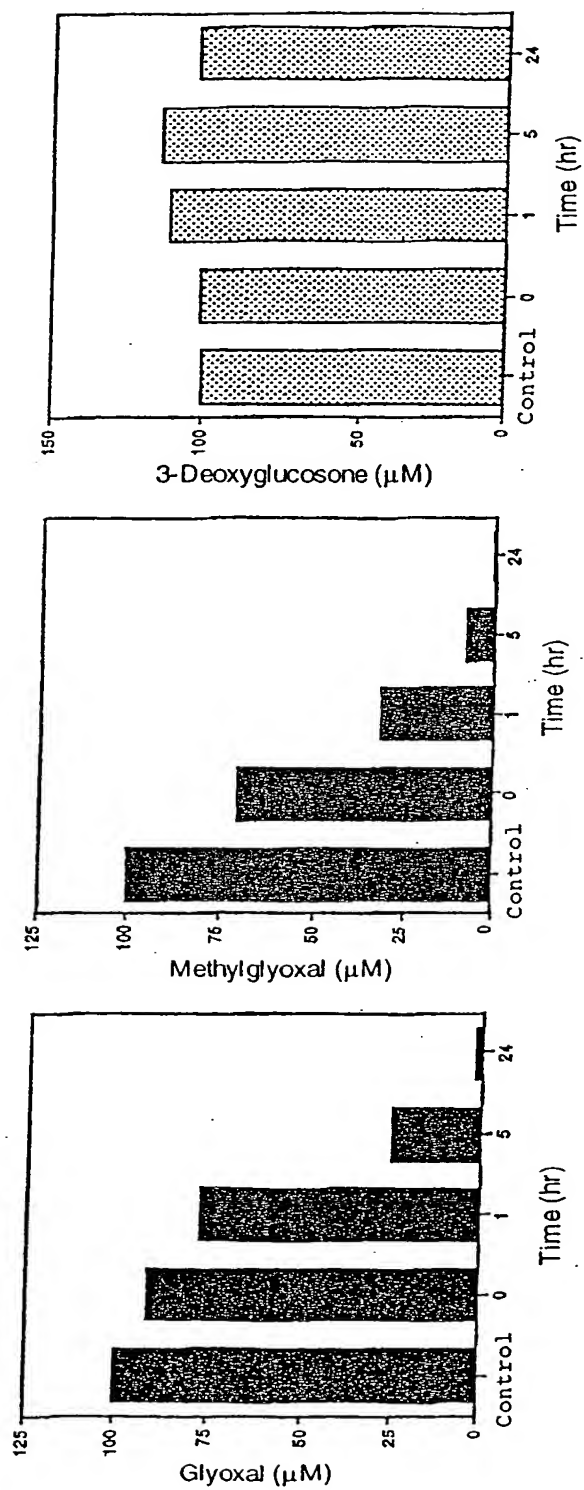
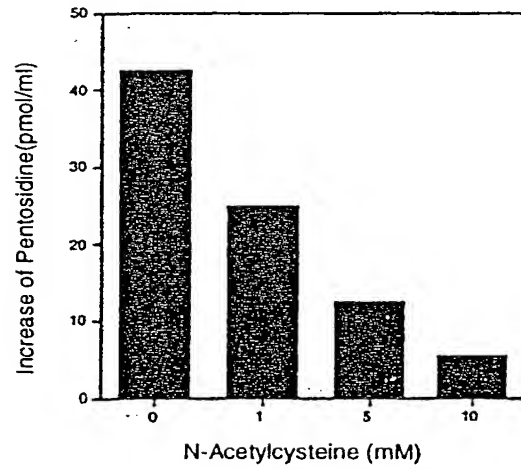
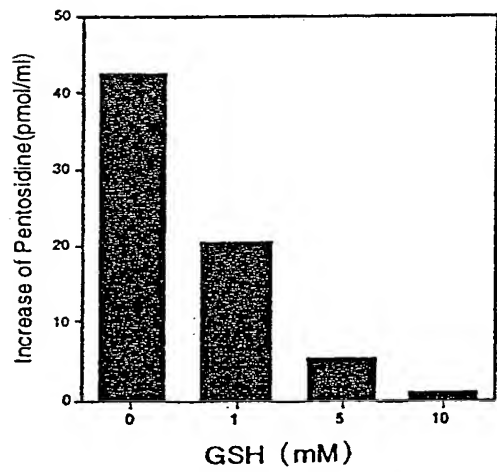
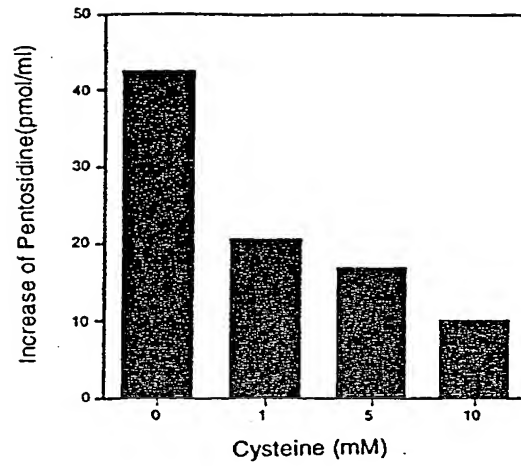
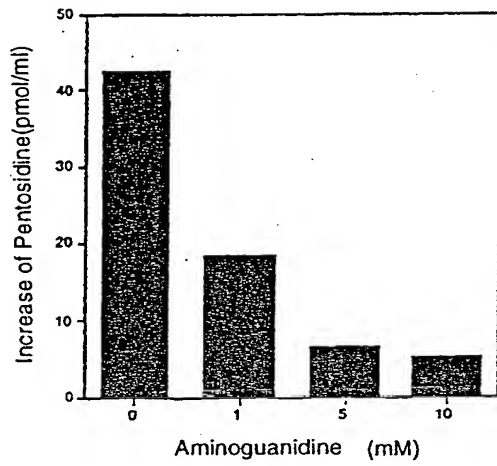


Figure 27



SEQUENCE LISTING

<110> KUROKAWA, Kiyoshi

MIYATA, Toshio

<120> Carbonyl-stress improving agent and peritoneal dialysate

<130> KRK002DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-237108

<151> 1998-08-24

<150> JP 1999-155393

<151> 1999-06-02

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

actggaccct ggctttactg c

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

ttggtgaggt ttgatccgca tg

22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

cctgcaccac caactgctta gcc

24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gatgtcatca tatttggcag gtt

23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ggcagaatca tcacgaagtg gtg

23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

ctgtaggaag ctcattcttc c

21